



Avaliação do teor em compostos bioativos e parâmetros de qualidade ao longo do processamento mínimo de couve-galega

Ana Catarina Silva Ferreira

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Departamento de Química

2016

Orientadora

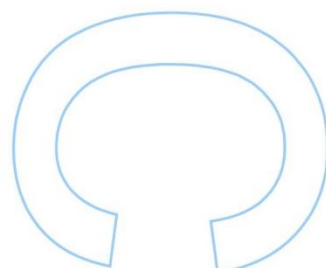
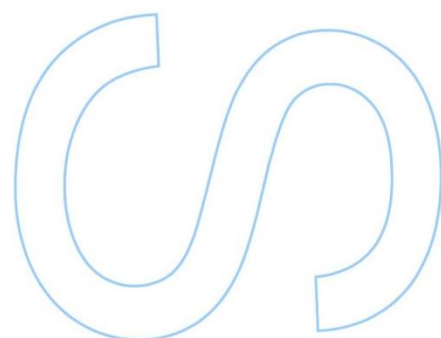
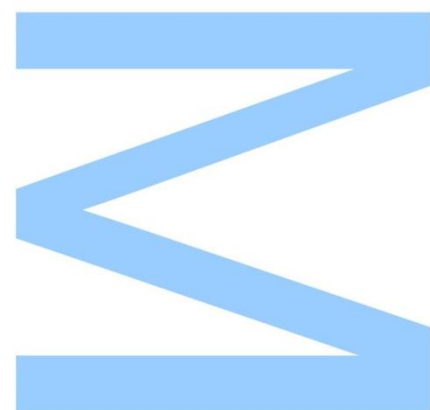
Doutora Susana Caldas Fonseca, Professora Auxiliar

Convidada, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientadora

Doutora Maria Beatriz Oliveira, Professora Associada,

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto



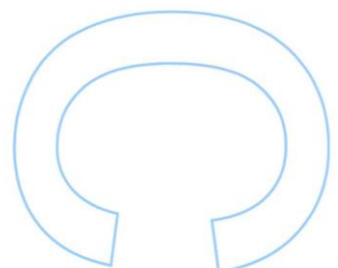
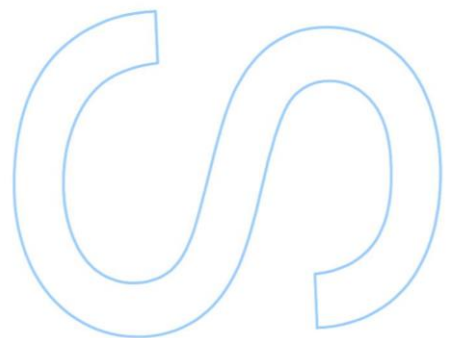
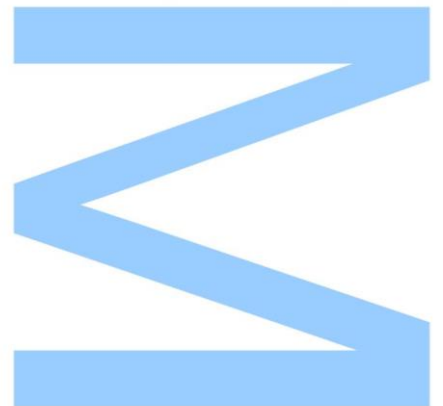


Universidade do Minho



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



AGRADECIMENTOS

Finda esta etapa, não posso deixar de estar grata à instituição que me acolheu nestes últimos anos e me permitiu absorver o máximo de conhecimento possível.

À minha orientadora, Professora Doutora Susana Fonseca, pela confiança que teve em mim, pelo apoio, disponibilidade e orientação, não só neste trabalho mas ao longo do meu percurso académico. Obrigada também pela tranquilidade que me transmitiu durante a realização desta tese.

À Professora Doutora Beatriz Oliveira pela disponibilidade e pelo auxílio prestado.

À Doutora Joana Santos pela paciência e pela prontidão para ajudar sempre que necessitei. Agradeço-lhe também todo o conhecimento transmitido.

Aos meus pais e à minha avó pelos esforços imensos que fizeram toda a vida, sem o qual esta etapa da minha vida (e tantas outras) nunca teria ocorrido. Espero um dia poder retribuir tudo que fizeram por mim.

À minha irmã pelas dicas, conselhos e amizade dados desde sempre. Obrigada pelo apoio nas minhas decisões.

Ao Pedro pela paciência, carinho e por acreditar em mim acima de tudo. Sem ti teria sido mais difícil concluir este trabalho. Obrigada por me acalmares quando precisei e por me teres ouvido e compreendido.

Aos meus amigos agradeço a paciência e compreensão pela falta de tempo e pelos passeios a que faltei. Quero que saibam que foi algo que me custou muito, mas tentei compensar sempre que pude.

Um agradecimento especial à Flávia, a minha companheira de tese, pelos desabafos, incentivo e apoio mútuo, tanto neste trabalho como noutras situações da vida.

RESUMO

Uma das problemáticas atuais a nível mundial é o aumento de um vasto leque de doenças crónicas, como é o caso da diabetes tipo 2, de vários tipos de cancro e de doenças cardiovasculares. Como resposta a este fenómeno a Organização Mundial de Saúde tem incentivado a prática de atividade física e o consumo de alimentos com efeitos protetores para a saúde, como é o caso das frutas e legumes. A couve-galega (*Brassica oleracea* L. var *acephala*) é uma couve tipicamente portuguesa, com uma enorme capacidade de adaptação a diferentes condições climáticas e tipos de solo, podendo ser cultivada em praticamente todo o país. Utilizada tradicionalmente na confeção de “caldo verde”, em que é cortada finamente e por isso extremamente perecível, esta couve é reconhecida como componente de uma alimentação saudável.

Os alimentos de origem vegetal possuem compostos, chamados de compostos bioativos, presentes em pequenas quantidades, com benefícios para a saúde, para além da nutrição básica. De forma a caracterizar a couve-galega em termos de componentes funcionais e parâmetros de qualidade, o objetivo deste trabalho foi quantificar a presença de compostos bioativos (teor em fenólicos totais, flavonóides e capacidade antioxidante pelos métodos de redução do radical DPPH, de redução do ferro (FRAP) e de redução do radical ABTS), bem como determinar a cor, a taxa de respiração e o teor de água desta couve, ao longo do seu processamento mínimo e armazenamento. Num primeiro estudo foi efetuada a determinação da taxa de respiração, dos compostos bioativos, da cor e do teor de água da couve-galega ao fim de 2 h e 24 h de armazenamento a 2, 10 e 20 °C. Após a análise dos resultados obtidos referentes à taxa de respiração foi realizado um estudo mais aprofundado, recorrendo a medições mais frequentes e durante um período de armazenamento superior de 48 h, de forma a avaliar o efeito da temperatura e tempo de armazenamento.

Os resultados obtidos mostram que ocorre lixiviação dos compostos bioativos, durante a operação de higienização, havendo uma diminuição no teor destes compostos e na atividade antioxidante. Apesar desta perda, parte dos compostos são, de forma geral, recuperados devido ao *stress* a que a couve-galega é exposta durante o armazenamento. Após o corte e antes da higienização foram contabilizadas $1,72 \pm 0,07$ mg de ácido gálico/g amostra fresca, sendo que esse valor decresce para $1,15 \pm 0,09$ mg de ácido gálico/g amostra fresca após a higienização e antes de ser

refrigerado. O valor de flavonóides, contabilizado sob a forma de mg de catequina/g amostra fresca, decrescem de $0,30 \pm 0,02$ para $0,18 \pm 0,02$, imediatamente antes da higienização e imediatamente após a mesma, respetivamente.

A atividade antioxidante da couve-galega é também afetada devido à perda de compostos causada pela higienização. A quantificação desta atividade recorrendo ao método de redução do radical DPPH teve uma diminuição de $0,73 \pm 0,06$ mg eq trolox/g amostra fresca na amostra após o corte e não higienizada, para $0,41 \pm 0,04$ após a higienização da couve-galega e antes da sua refrigeração. O mesmo acontece quando o método utilizado é o de redução do ferro (FRAP), sendo o valor antes da higienização $6,49 \pm 0,43$ μ mol eq sulfato ferroso/g amostra fresca e o valor após higienização sem refrigeração $4,35 \pm 0,24$ μ mol eq sulfato ferroso/g amostra fresca. O método de redução do radical ABTS mostra uma diminuição de $0,034 \pm 0,001$ mg eq de trolox/g amostra fresca antes da higienização para $0,023 \pm 0,001$ mg eq trolox/g amostra fresca após a higienização sem que ocorra refrigeração.

Os efeitos na cor não são significativos e ocorre um aumento do teor de água para as amostras que sofreram higienização (de $87,6 \pm 0,2\%$ antes da higienização para $90,2 \pm 0,2\%$ após a higienização) pois parte da água utilizada para a higienização é incorporada no produto.

Durante o armazenamento ocorre uma diminuição nos valores da taxa de consumo de O_2 (RO_2) e na taxa de produção de CO_2 (RCO_2). Ao fim de 24 h de armazenamento as taxas de respiração começam a estabilizar, sendo ainda mais notório ao fim de 48 h. As amostras armazenadas a temperaturas mais elevadas apresentam valores de RO_2 e RCO_2 mais elevados, visto que as condições a que são sujeitas requerem um maior esforço fisiológico por parte da couve-galega, resultando num maior consumo de O_2 e maior produção de CO_2 . Os valores das taxas de consumo de O_2 ao fim de 48 h 30 min são de $23,9 \pm 1,6$ mL.kg⁻¹.h⁻¹ para a amostra a 2 °C, de $71,9 \pm 3,77$ mL.kg⁻¹.h⁻¹ para a amostra a 10 °C e $124,9 \pm 12,4$ mL.kg⁻¹.h⁻¹ para o armazenamento a 20 °C. Relativamente à taxa de produção de CO_2 os valores obtidos ao fim de 48 h 30 min foram $27,6 \pm 5,7$ mL.kg⁻¹.h⁻¹ para amostra armazenada a 2 °C, $59,5 \pm 13,9$ mL.kg⁻¹.h⁻¹ para a amostra a 10 °C e $98,6 \pm 11,7$ mL.kg⁻¹.h⁻¹ para a amostra armazenada a 20 °C.

De forma a aumentar o tempo de armazenamento de um produto tão perecível como a couve-galega mais estudos terão de ser efetuados, de forma a compreender

quais os possíveis efeitos que o armazenamento em atmosfera modificada e o processamento têm sobre os compostos bioativos e as propriedades fisiológicas.

Palavras-chave: couve-galega, compostos bioativos, atividade antioxidante, processamento mínimo, taxa de respiração

ABSTRACT

Nowadays one of the main problems worldwide is the increase in a wide range of chronic diseases, like type II diabetes, several types of cancer e cardiovascular diseases. As an answer to this phenomenon the World Health Organization has been encouraging the practice of physical activity and the consumption of foods with health protective effects, like fruit and vegetables. The Galega kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) is a Portuguese kale with a big capacity of adaptation to different climatic conditions and types of soil, thus being able to be cultivated in practically the entire country. Traditionally used in the making of “caldo verde” (green soup), in which it is finely cut and thus extremely perishable, this kale is well-known as a component to a healthy diet.

Vegetable foods have compounds, known as bioactive compounds, present in small quantities with health benefits, beside basic nutrition. To characterize the Galega kale in terms of functional components e quality parameters the objective of this work was quantify the presence of bioactive compounds (total phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity by the reduction of the radical DPPH, reduction of iron (FRAP) and reduction of the radical ABTS methods), as well as determine the color, respiration rate measured in O_2 consumption rate (RO_2) and CO_2 production rate (RCO_2) and water content, during the minimal processing and storage. In a first study it was made a preliminary assessment of the respiration rate of Galega kale, as well as the determination of bioactive compounds, color and water content. After the analysis of the results related to the respiration rate it was conducted a more profound study with measurements during a longer storage time.

The results obtained show that occurs the leaching of bioactive compounds, causing a decrease in the content of this compounds and in the antioxidant capacity. Besides this loss, part of the compounds is, in general, recovered due to the stress to which this kale is exposed during the storage. After being cut and before sanitation there were $1,72 \pm 0,07$ mg of galic acid / g of fresh weight, a value that decreases to $1,15 \pm 0,09$ mg of galic acid / g of fresh weight after sanitation and before refrigeration. The value of flavonoids, measure in the form of mg of catechin / g of fresh weight decreased from $0,30 \pm 0,02$ to $0,18 \pm 0,02$ right before and right after sanitation, respectively.

The antioxidant activity of Galega kale is also impaired due to the loss of compounds due to sanitation. The quantification of this activity using the reduction of the radical DPPH method resulted in a decrease from $0,73 \pm 0,06$ mg eq of trolox / g of fresh weight in the sample after being cut and before sanitation to $0,4 \pm 0,04$ after sanitation of Galega kale and before its refrigeration. The same occurs when the method used is the reduction of iron (FRAP), being that the value before the sanitation $6,49 \pm 0,43$ μ mol of ferrous sulphate / g of fresh weight and the value after sanitation without refrigeration $4,35 \pm 0,24$ μ mol of ferrous sulphate / g of fresh weight. The reduction of the radical ABTS method shows a decrease from $0,034 \pm 0,001$ mg eq trolox / g fresh weight before sanitation to $0,023 \pm 0,001$ mg eq trolox / g fresh weight after sanitation without refrigeration.

The effects in the color are not significant and it occurs an increase in the water content to the samples that weren't sanitized (from $87,6 \pm 0,2\%$ before sanitation to $90,2 \pm 0,2\%$ after sanitation), because part of the water used for the sanitization was incorporated in the product.

During storage time a decrease of the RO_2 and RCO_2 values occurs. After 24 hours the values start to stabilize, being more notorious after 48 hours. The samples stored at higher temperatures show higher values of RO_2 and RCO_2 , since the conditions to which are exposed require a bigger physiological effort from the Galega kale, resulting in a bigger consumption of O_2 and bigger production of CO_2 . The value of O_2 consumption rates after 48h 30 min are of $23,9 \pm 1,6$ mL.kg⁻¹.h⁻¹ to the sample at 2 °C, of $71,9 \pm 3,77$ mL.kg⁻¹.h⁻¹ to the sample at 10 °C and of $124,9 \pm 12,4$ mL.kg⁻¹.h⁻¹ to the sample at 20 °C. Relatively to the CO_2 production rate after 48h 30 min the values obtained were of $27,6 \pm 5,7$ to the sample stored at 2 °C, $59,5 \pm 13,9$ mL.kg⁻¹.h⁻¹ to the sample at 10 °C and $98,6 \pm 11,7$ mL.kg⁻¹.h⁻¹ to the sample stored at 20 °C.

To improve the storage time of a product so perishable like the Galega kale more studies will have to be conducted to understand which possible effects that the storage in modified atmosphere e the processing have on the bioactive compounds and physiological properties.

Keywords: Galega kale, bioactive compounds, antioxidant activity, minimal processing, respiration rate

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vii
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	4
2.1. TAXONOMIA	4
2.2. CARATERIZAÇÃO COMPOSICIONAL DA COUVE-GALEGA	5
2.3. COMPOSTOS BIOATIVOS	8
2.3.1. Atividade Antioxidante	9
2.3.2. Compostos Fenólicos	10
2.3.3. Flavonóides	12
2.3.4. Efeito na Saúde.....	13
2.4. PRODUTOS FRESCOS PRÉ-CORTADOS	17
2.5. DESINFEÇÃO	19
2.6. EMBALAMENTO EM ATMOSFERA MODIFICADA	23
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	27
3.1. Estudo I – Avaliação do teor em compostos bioativos e parâmetros de qualidade ao longo do processamento mínimo de couve-galega.....	27
Preparação das amostras.....	27
Medição taxa de respiração	28
Medição dos parâmetros de cor.....	29
Medição do teor de água	30
Análise de compostos bioativos e caracterização da atividade antioxidante.....	30
Preparação dos extratos.....	30
Determinação dos compostos fenólicos totais.....	31
Determinação de flavonóides	31
Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)	31
Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).....	32
Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Radical ABTS•+	32

Tratamento estatístico de dados	33
3.2. ESTUDO II - Influência do tempo e temperatura na taxa de respiração de couve-galega minimamente processada	33
Tratamento estatístico de dados	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
Estudo I	34
Medição taxa de respiração	34
Medição dos parâmetros de cor.....	36
Medição do teor de água	38
Teor de compostos fenólicos totais	39
Teor de flavonóides	41
Determinação da atividade antioxidante	42
Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH	42
Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)	44
Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS	45
ESTUDO II	47
5. CONCLUSÃO	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE QUADROS

Tabela 1 - Composição em hidratos de carbono e ácidos orgânicos de couve-galega por 100 g de parte edível e por porção recomendada (INSA).	5
Tabela 2 - Composição em gordura e ácidos gordos da couve-galega por 100 g de parte edível e por porção recomendada (INSA).	6
Tabela 3 - Aminoácidos essenciais das folhas de couve-galega comparativamente com as "proteínas ideais" da Organização Mundial de Saúde. Adaptado de (Ayaz, 2006)	7
Tabela 4 - Parâmetros de cor (média \pm desvio padrão) da couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.	36
Tabela 5 - Teor de água (média \pm desvio padrão) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.	38
Tabela 6 - Teor em compostos fenólicos totais (media \pm desvio padrão) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.	40
Tabela 7 - Teor em flavonóides (média \pm desvio padrão) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.	41
Tabela 8 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento medida sob a forma de mg equivalentes de trolox / g amostra fresca (média \pm desvio padrão) recorrendo ao método DPPH.	43
Tabela 9 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento medida sob a forma de μ mol equivalentes de sulfato ferroso / g amostra fresca (média \pm desvio padrão) recorrendo ao método FRAP.	44
Tabela 10 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento sob a forma de mg equivalentes de trolox / g amostra fresca (média \pm desvio padrão) recorrendo ao método ABTS.	46
Tabela 11 - Valores de RO_2 ($mL.kg^{-1}.h^{-1}$) de couve-galega ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}C$) de armazenamento.	48
Tabela 12 - Valores de RCO_2 ($mL.kg^{-1}.h^{-1}$) de couve-galega ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}C$) de armazenamento.	50
Tabela 13 - Valores de RQ de couve-galega ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}C$) de armazenamento.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de couve-galega.....	4
Figura 2 - Mecanismos de ação dos compostos antioxidantes (Caldas, 2014).	9
Figura 3 - Estruturas químicas de algumas classes de compostos fenólicos (Carvalho, 2008)... ..	11
Figura 4 - Estrutura do núcleo flavânico (Gonçalves, 2007).	12
Figura 5 - Roda da Alimentação Mediterrânica (Rodrigues, 2016)	16
Figura 6 - Taxa de consumo de O_2 ($mL.kg^{-1}.h^{-1}$) de couve-galega cortada ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}C$) de armazenamento. Pontos são média de 3 réplicas e barras intervalo de confiança a 95 %.	34
Figura 7 - Taxa de produção de CO_2 ($mL.kg^{-1}.h^{-1}$) de couve-galega cortada ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}C$) de armazenamento. Pontos são média de 3 réplicas e barras intervalo de confiança a 95 %.	34
Figura 8 - Parâmetros a^* , b^* e L^* (média \pm intervalo de confiança a 95%) da couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.	37
Figura 9 - Valores de TCD (média \pm intervalo de confiança a 95%) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.	37
Figura 10 - Teor de água (média \pm intervalo de confiança a 95%) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.	39
Figura 11 - Teor em fenólicos totais (média \pm intervalo de confiança a 95%) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.	41
Figura 12 - Teor em flavonóides (média \pm intervalo de confiança a 95%) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.	42
Figura 13 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento sob a forma de mg equivalentes de trolox / g amostra fresca (média \pm intervalo de confiança a 95%) pelo método DPPH.....	44
Figura 14 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento sob a forma de μmol equivalentes de sulfato ferroso / g amostra fresca (média \pm intervalo de confiança a 95%) recorrendo ao método FRAP.	45
Figura 15 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento sob a forma de mg equivalentes de trolox / g amostra fresca (média \pm intervalo de confiança a 95%) recorrendo ao método ABTS.....	47
Figura 16 - Valores de RO_2 ($mL.kg^{-1}.h^{-1}$) de couve-galega ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}C$) de armazenamento. Pontos são média de 3 réplicas e barras intervalo de confiança a 95 %. a) Pontos obtidos durante 48h 30 min. b) Pontos obtidos nas primeiras 2h de medição.	49
Figura 17 - Valores de RCO_2 ($mL.kg^{-1}.h^{-1}$) de couve-galega ao longo do tempo (h) ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}C$) de armazenamento. Pontos são média de 3 réplicas e barras intervalo de confiança a 95 %. a) Pontos obtidos durante 48h 30 min. b) Pontos obtidos nas primeiras 2h de medição.	51

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido um aumento substancial da incidência de certas doenças crónicas, como o cancro, doenças cardiovasculares, hipercolesterolemia, diabetes tipo II e obesidade como resultado de mudanças no estilo de vida, como menor atividade física e aumento do consumo de alimentos excessivamente calóricos e com baixo valor nutricional (Pi-Sunyer, 1993).

De forma a contrariar este fenómeno, várias organizações responsáveis pela promoção da saúde, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), têm vindo a aconselhar um aumento do consumo de frutas e legumes, uma vez que estas demonstram ter efeitos protetores contra várias enfermidades e possuem compostos nutricionais essenciais ao organismo humano (Murcia, 2009).

Os efeitos benéficos dos vegetais na saúde humana provêm do seu teor em compostos bioativos, que são microconstituintes das plantas que intervêm nos mecanismos de defesa das mesmas (Asami, 2003; Ferioli, 2013; Saura-Calixto, 2009).

As suas propriedades antioxidantes permitem à planta resistir ao *stress* oxidativo. No organismo humano estes antioxidantes vão complementar a função dos antioxidantes endógenos, aumentando a proteção do organismo contra espécies reativas, diminuindo a ocorrência de certas doenças (Liu, 2013; Peng, 2008).

Exemplos de compostos bioativos são os polifenóis, em particular os flavonóides e vários tipos de vitaminas, como a vitamina E (Becerra-Moreno, 2014; Ferioli, 2013; Saura-Calixto, 2009).

Como consequência às associações benéficas para a saúde atribuídas aos produtos de origem vegetal, os consumidores têm procurado cada vez mais produtos vegetais não processados (Vale, 2015). A escolha por produtos frescos ou com o mínimo de processamento face aos processados decorre da perceção que o processamento, apesar de alargar o tempo de vida útil dos produtos e os transformar em produtos com novas características e aplicações, pode acarretar menos benefícios ou até riscos para a saúde devido à perda da qualidade inicial e à presença de compostos prejudiciais, como por exemplo o açúcar e o sal.

Outra tendência do mercado atual é a conveniência que é exigida aos produtos. Devido a um ritmo de vida mais rápido e no qual cada vez menos tempo se

dispõe para comprar os alimentos e preparar essas refeições é necessário consumir produtos que não necessitem de tanta preparação para serem consumidos e que tenham um tempo de prateleira alargado.

É neste contexto que surgem os produtos frescos cortados e embalados, que implicam um processamento mínimo (que praticamente não altere o produto inicial, como a lavagem, o descasque, o corte e a higienização). O consumidor passa assim a ter ao seu dispor produtos convenientes e saudáveis, sem ter de abdicar da sua frescura (Oliveira, 2015).

De acordo com a Associação Internacional de Produtos Frescos Cortados (IFPA), estes produtos pré-cortados não possuem aditivos na sua constituição a sua preservação é um problema (Oliveira, 2015). Uma vez que a sua preparação geralmente aumenta a taxa de respiração, e consequentemente acelera a sua degradação, foi preciso encontrar alternativas que permitissem manter a qualidade do produto fresco cortado por mais tempo.

A refrigeração é essencial para a conservação dos produtos frescos cortados. O embalamento em atmosfera modificada (EAM) é uma possibilidade para complementar a cadeia de frio, sendo que a refrigeração não pode ser nunca dispensada (Fonseca, 2002).

Um exemplo de um produto que beneficia do EAM é a couve-galega cortada. Para que seja conveniente para o consumidor, que geralmente a utiliza na confeção de pratos típicos portugueses como o caldo verde, que é uma sopa à base de batata, azeite, alho, chouriço e couve-galega finamente cortada, esta couve é encontrada à venda previamente cortada.

A couve-galega é uma couve portuguesa com importância na dieta dos portugueses, uma vez que é facilmente cultivável devido à sua grande adaptabilidade a vários tipos de solo e condições climáticas (Dias, 1995).

O objetivo da presente tese é determinar os compostos bioativos presentes na couve-galega e a influência das operações de processamento mínimo e do tempo e temperatura de armazenamento a que o produto é submetido no teor desses compostos, de forma a conhecer melhor quais os benefícios que o consumo deste produto tradicional português traz. A influência das operações de processamento mínimo e do tempo e temperatura de armazenamento foram igualmente avaliadas nos

parâmetros fisiológicos e de qualidade (taxa de respiração, cor e teor de água) da couve-galega cortada.

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1. TAXONOMIA

A espécie *Brassica oleracea* L. tem uma grande representatividade em Portugal. As couves portuguesas são diversas, como é o caso da couve repolho, couve tronchuda, couve-roxa, couve lombarda entre outras, com elevado grau de adaptabilidade às condições geográficas e climáticas, especialmente aos invernos moderados e verões frescos caraterísticos do litoral Norte e Centro de Portugal (Dias, 1995).

A variedade *Brassica oleracea* L. var *acephala* é vulgarmente conhecida como couve-galega. Esta couve é cultivada por todo o território português e um pouco pelo Norte de Espanha (Dias, 1995). Chauvet (1985) afirmava que a couve-galega era onnipresente em Portugal, sendo das primeiras a ser cultivada por alguém que tenha uma porção de terra, por mais pequena que seja.

Pensa-se que esta couve tenha sido introduzida em Portugal aquando da ocupação da Península Ibérica pelos Celtas, sendo isso ainda incerto, mas existindo evidências ancestrais em vários pontos da Europa (Dias, 1995).

A couve-galega é uma couve sem “cabeça”, podendo ter um caule longo. As suas folhas são largas e com um veio central proeminente, como se pode ver na Figura 1. É uma planta resistente e resiliente, que não necessita de muitos cuidados para sobreviver, sendo essa umas das razões pela qual é cultivada em praticamente todos os terrenos para cultivo (Dias, 1995).



Figura 1 - Exemplo de couve-galega

2.2. CARATERIZAÇÃO COMPOSICIONAL DA COUVE-GALEGA

Os produtos de origem vegetal têm vindo a ganhar importância no que toca à alimentação humana. Sendo uma fonte variada e rica em compostos promotores da saúde, a sua caracterização tem vindo a ser mais extensiva, de forma a melhorar as recomendações nutricionais fornecidas pelos profissionais de saúde (Ayaz, 2006).

Uma vez que a couve-galega é uma couve de crescimento rápido ela é frequentemente utilizada como forragem para a pecuária (Rosa, 1996). Já na alimentação humana a couve-galega é geralmente consumida no caldo verde, uma sopa à base de batata e couve-galega cortada finamente (ca. 1 mm), complementada por azeite, alho e chouriço (Dias, 1995). Outros pratos têm também esta couve como ingrediente, como é o caso do cozido à portuguesa ou alguns tipos de feijoadas. Surge, assim, a necessidade de conhecer a composição nutricional deste produto, para que o consumidor possa fazer uma escolha informada relativamente ao que consome.

De acordo com o Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge, em 100 g de couve-galega cerca de 3 g correspondem a açúcares, sendo praticamente todos mono- ou dissacarídeos, como representado na Tabela 1 (INSA). Estudos mostraram que o açúcar solúvel mais abundante na couve-galega é a frutose, seguida da glucose e da sacarose (Ayaz, 2006).

Quanto a ácidos orgânicos, estes parecem encontrar-se em quantidades extremamente baixas, não chegando sequer a 1 % m/m do produto (INSA). O ácido cítrico e o ácido málico são os que se encontram em maiores quantidades, sendo o primeiro o mais abundante (Ayaz, 2006).

Tabela 1 - Composição em hidratos de carbono e ácidos orgânicos de couve-galega por 100 g de parte edível e por porção recomendada (INSA).

Componentes	Por 100 g da parte edível	Por porção recomendada (180 g)
Total de hidratos de carbono disponíveis (g)	3,1	5,6
Mono+ dissacarídeos (g)	2,7	4,9

Em termos do teor de gordura, o Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge, indica uma quantidade de cerca de 0,4 g de gordura por 100 g de produto, tal como mostra a Tabela 2 (INSA). Relativamente aos ácidos gordos, o ácido linoleico (18:2n, ω 6) representa $\frac{3}{4}$ dos ácidos gordos totais, predominando os ácidos gordos polinsaturados. Por outro lado o estudo de Ayaz (2006) refere o ácido linoleico como o segundo mais abundante na couve-galega (12% dos ácidos gordos totais), sendo que o mais abundante é o ácido α -linolénico (18:3n, ω 3), representando 54% dos ácidos gordos totais. A variabilidade apresentada dever-se-á à variação existente na composição da couve-galega, variando com a origem geográfica e as condições climatéricas a que é sujeita.

Tabela 2 - Composição em gordura e ácidos gordos da couve-galega por 100 g de parte edível e por porção recomendada (INSA).

Componentes	Por 100 g da parte edível	Por porção recomendada
Gordura total (g)	0,4	0,7
Ácidos gordos saturados (g)	0,1	0,2
Ácidos gordos monoinsaturados (g)	0	0
Ácidos gordos polinsaturados (g)	0,3	0,5
Ácido linoleico (g)	0,3	0,5

O ácido linoleico e o ácido α -linolénico são fundamentais para o organismo humano, mas não são sintetizados pelo ser humano, pelo que apenas estão presentes caso sejam ingeridos. Apesar de não ser dos alimentos com as maiores quantidades destes compostos, a couve-galega é uma boa fonte, satisfazendo as necessidades em ácidos gordos ω 3 e ω 6 (Ayaz, 2006).

É de notar também que a percentagem de ácidos gordos insaturados relativamente ao total de ácidos gordos é muito superior à dos ácidos gordos saturados, tornando este num alimento mais saudável e dos que se devem consumir preferencialmente (Ayaz, 2006; Candeias).

Os aminoácidos são nutrientes de grande importância nos alimentos, influenciando algumas das suas propriedades organoléticas como a cor, o gosto e o aroma. O trabalho de Ayaz (2006) indica que em 100 g de produto seco cerca de 27 g

são proteína, um valor que se distancia muito do referido na tabela de composição de alimentos do Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge, que é de 2,4 g por 100 g de produto.

Ayaz (2006) refere que o aminoácido mais abundante na couve-galega é o glutamato (12,2 % do teor total de aminoácidos), seguido do ácido aspártico. Outros aminoácidos presentes mas em quantidades inferiores são, por exemplo a cisteína, a histidina, a metionina e o triptofano, sendo que todos os aminoácidos, com exceção da lisina, se encontram acima dos valores recomendados pela OMS, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Aminoácidos essenciais das folhas de couve-galega comparativamente com as "proteínas ideais" da Organização Mundial de Saúde. Adaptado de (Ayaz, 2006)

Aminoácido	% de aminoácidos totais	% de aminoácido "ideal" recomendada pela OMS
Treonina	5,1	3,4
Valina	6,3	3,5
Isoleucina	4,7	2,8
Leucina	7,5	6,6
Triptofano	3,3	1,1
Lisina	5,5	5,8
Metionina + cisteína	3,5	2,5
Fenilalanina + tirosina	10,0	6,3

Os minerais são um grupo de nutrientes com importância para o desenvolvimento correto do organismo humano e manutenção do estado de saúde. A sua importância decorre do facto da maior parte dos minerais serem ativadores essenciais de reações catalisadas por enzimas. Na couve-galega, dentro dos minerais, o micronutriente presente em maior quantidade é o cálcio, seguido do potássio (Ayaz, 2006).

Para além dos nutrientes presentes na couve-galega que foram referidos anteriormente, existem outros compostos, presentes em menores quantidades, que trazem benefícios para o ser humano, que vão para lá da nutrição básica (Liu, 2013). Estes são os compostos bioativos ou fitoquímicos que serão descritos mais pormenorizadamente na seção seguinte.

2.3. COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos resultam do metabolismo secundário das plantas, tendo um papel fundamental na defesa das *Brassicac*s contra os fatores externos como os animais herbívoros, pragas e microrganismos patogénicos (Asami, 2003; Wennberg, 2006). Os fitoquímicos também têm como função ajudar a planta a regular-se em condições de *stress*, como falta ou excesso de luz, temperaturas excessivamente altas ou baixas, *stress* hídrico e até mesmo após o seu corte no período pós-colheita (Reyes, 2007).

Muitos destes compostos ainda não são conhecidos, assim como outros fatores associados, como por exemplo a sua biodisponibilidade, o seu metabolismo e as quantidades recomendadas para o seu consumo diário. Sendo assim, é necessário um estudo continuado dos seus mecanismos de ação e dos seus efeitos na saúde humana (Liu, 2013).

Em termos gerais a família das *Brassicac*s, e em particular a couve-galega, são vegetais ricos em fitoquímicos. Os mais comumente encontrados são os compostos fenólicos (ou polifenóis), os carotenóides, os glucosinolatos e vitaminas, como a C (ácido ascórbico) e a E (tocoferol) e pró-vitamina A (Becerra-Moreno, 2014; Ferioli, 2013; Saura-Calixto, 2009).

A produção destes compostos é variável entre espécies e variedades, dependendo também das condições geográficas e ambientais em que a planta é cultivada. Sendo assim, duas plantas da mesma variedade podem ter uma composição diferente em compostos bioativos se expostas a diferentes condições edafoclimáticas durante o seu crescimento (Liu, 2013).

Vários estudos indicam que a diversidade de compostos bioativos favorece os efeitos benéficos que estes têm, uma vez que se complementam e aparentam ter maior bioatividade e trazer mais benefícios quando obtidos a partir de várias frutas e legumes (Liu, 2013).

2.3.1. Atividade Antioxidante

Todos os organismos produzem, durante o seu metabolismo, compostos com capacidade oxidante e, para combater-los, compostos antioxidantes, de forma a criar um equilíbrio, evitando o melhor possível o dano de tecidos. Caso ocorra desequilíbrio que favoreça as espécies reativas, estamos perante o *stress* oxidativo (Prior, 2000).

Quando o *stress* oxidativo ocorre no organismo humano, as espécies reativas podem danificar estruturas celulares fundamentais como o ADN, proteínas e lípidos, danificando a célula, podendo até destruí-la (Llacuna, 2012; Saura-Calixto, 2009). Com o aumento da idade o *stress* oxidativo aumenta e a acumulação de danos oxidativos leva à ocorrência de doenças crónicas como vários tipos de cancro e doenças cardiovasculares (Prior, 2000).

Grande parte dos benefícios associados aos compostos bioativos provém da sua capacidade antioxidante, ou seja da aptidão para combater os processos oxidativos que ocorrem quer na planta quer no organismo humano (Peng, 2008).

Estes compostos têm vários mecanismos de combate ao *stress* oxidativo, podendo agir por captação de radicais livres, que são produtos dos processos de oxidação no organismo, por inativação de iões metálicos, por remoção de espécies reativas de oxigénio ou por destruição de peróxidos, que são espécies muito instáveis (Brewer, 2011; Llacuna, 2012; Ramalho, 2006; Sousa, 2011).

Geralmente o seu mecanismo de ação (Figura 2) consiste na doação de eletrões ou átomos de hidrogénio aos radicais, tornando-os em moléculas estáveis e impedindo que reajam e propaguem para uma situação de *stress* oxidativo (Liu, 2004; Llacuna, 2012).

.

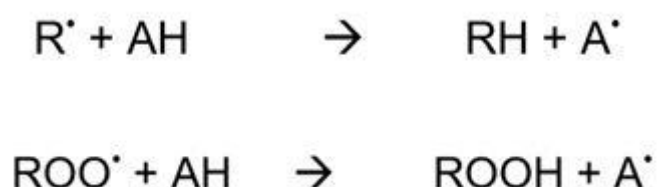


Figura 2 - Mecanismos de ação dos compostos antioxidantes (Caldas, 2014).

Caso o *stress* oxidativo ocorra em alimentos, como é o caso da oxidação lipídica, podem gerar-se alterações de cor, odor e sabor que levam à perda de qualidade e segurança do produto (Borneo, 2009). Tal como outras reações oxidativas, a oxidação lipídica é uma reação em cadeia, causando danos que se vão acumulando gradualmente. Esta reação é composta por três fases principais: a iniciação, a propagação e a terminação (Valavanidis, 2006).

Durante a iniciação ocorre a formação de uma espécie altamente reativa, o radical livre alquilo ($R\bullet$). Este reage com o oxigénio atmosférico, dando origem ao radical peróxilo ($ROO\bullet$) e a um hidroperóxido (Valavanidis, 2006). O radical peróxilo reage com um lípido insaturado, originando outro radical e outro hidroperóxido, numa reação cíclica. Uma vez que os hidroperóxidos também são muito instáveis, dão origem a radicais, acelerando a propagação (Valavanidis, 2006). O ciclo de reações termina quando dois radicais se combinam, formando uma molécula termodinamicamente mais estável (Valavanidis, 2006).

Um bom antioxidante necessita ter uma grande efetividade, mesmo em pequenas quantidades, ser versátil e possuir uma variabilidade operativa que lhe permita atuar sobre vários substratos (Sies, 1997).

Os antioxidantes apresentam grande variedade de estruturas e pesos moleculares (Saura-Calixto, 2009). Existem muitos compostos presentes na couve-galega que apresentam uma boa capacidade antioxidante, entre eles os compostos fenólicos e as vitaminas C e E (Fuchs-Tarlovsky, 2013; Saura-Calixto, 2009).

2.3.2. Compostos Fenólicos

Após a colheita da couve-galega as alterações de temperatura, luz e até o corte podem ativar mecanismos que induzem a produção de novos compostos de resposta ao *stress* como os compostos fenólicos (Reyes, 2007).

A estrutura dos polifenóis consiste em vários anéis benzénicos com um ou mais grupos hidroxilo (Figura 3) (Bravo, 1998; Liu, 2013; Naczk, 2004).

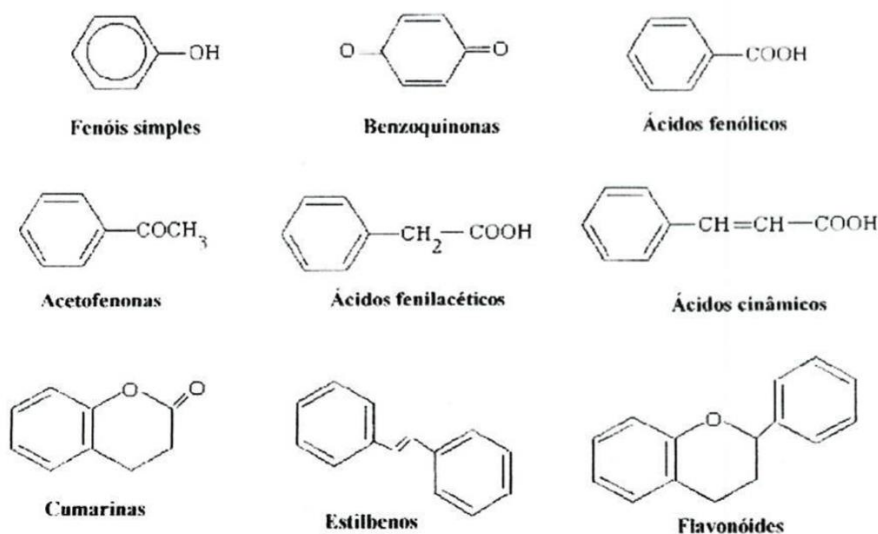


Figura 3 - Estruturas químicas de algumas classes de compostos fenólicos (Carvalho, 2008).

A estrutura química destes compostos varia consideravelmente, tendo sido já identificadas mais de 8000 compostos (Kris-Etherton, 2002) de várias categorias de acordo com a sua estrutura, sendo essa divisão pouco consensual.

Os principais grupos de compostos fenólicos são os flavonóides (de todos o grupo mais estudado e o mais presente nos alimentos de origem vegetal), os ácidos fenólicos, onde se incluem o ácido benzóico e o ácido cinâmico, os estilbenos, as cumarinas e os taninos cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 3 (Kris-Etherton, 2002; Liu, 2013).

As propriedades apresentadas pelos polifenóis são afetadas pela sua estrutura química, sendo que compostos com estrutura diferente diferem em termos de biodisponibilidade, capacidade antioxidante e interação com os recetores celulares e enzimas (Scalbert, 2000). O estudo pormenorizado da capacidade antioxidante de cada produto em específico auxilia os profissionais de saúde a estruturarem as suas recomendações para que os benefícios da dieta na saúde sejam maximizados (Ninfali, 2005).

Nas plantas estes compostos são estão envolvidos na sua reprodução e crescimento, ativando mecanismos de defesa contra patogénicos, parasitas, predadores e contra a radiação UV podendo alguns contribuir para a cor da planta (Liu, 2013).

Dos compostos fenólicos ingeridos pelo ser humano, cerca de 1/3 são ácidos fenólicos, sendo o restante maioritariamente flavonóides (Liu, 2013; Scalbert, 2000). Esta razão varia de acordo com o tipo e quantidade de fruta e legumes ingeridos, uma vez que o consumo varia ao longo do ano, com a distribuição geográfica e com as preferências de cada indivíduo (Hertog, 1993).

As couves portuguesas, na qual se encontra incluída a couve-galega, são das couves com maior teor em compostos fenólicos, podendo ser detetada variabilidade entre couves com a mesma origem (Ferioli, 2013).

O processamento efetuado ao alimento influencia o seu teor em compostos fenólicos, podendo nalguns casos aumentar ou noutros diminuir, consoante uma série de fatores como o tempo e a temperatura de processamento (Burda, 1990).

2.3.3. Flavonóides

Os flavonóides são o grupo dos compostos fenólicos com maior relevância na dieta, constituindo cerca de 80 % dos polifenóis (Ferioli, 2013).

Estruturalmente estes compostos apresentam dois anéis aromáticos (A,B) ligados por um anel heterocíclico pirânico ou anel C (Liu, 2013), como mostra a figura 4.

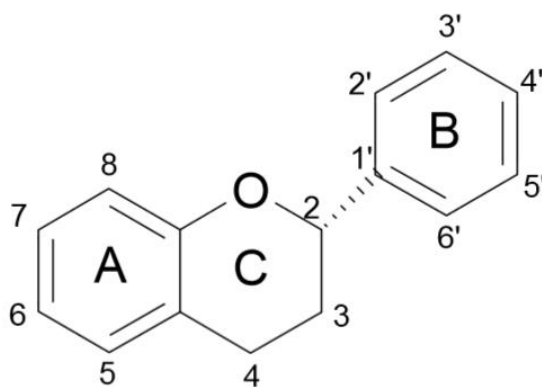


Figura 4 - Estrutura do núcleo flavânico (Gonçalves, 2007).

Dependendo do anel C, estes compostos podem ser classificados em vários grupos, sendo eles os flavonóis, as flavonas, os flavan-3-óis, as flavononas, as antocianidinas, as isoflavonas (Liu, 2013; Prior, 2000).

Estes compostos caracterizam-se por uma elevada atividade antioxidante, sendo capazes de captar radicais livres e espécies reativas de oxigénio, impedindo que estas causem danos em estruturas celulares como ADN, proteínas e lípidos (Cristobal, 2000; Kris-Etherton, 2002; Martínez-Flórez, 2002).

Para além disso também podem quelar iões metálicos pró-oxidantes impedindo a formação de radicais livres (Cristobal, 2000; Sousa, 2011), reciclar ou estimular outros antioxidantes (Kris-Etherton, 2002; Sousa, 2011) e ajudar a ativar a produção de antioxidantes endógenos (Sousa, 2011).

Tal como os compostos fenólicos, o teor em flavonóides varia com o tipo de alimento e com a sua origem geográfica, acontecendo o mesmo com a fração de polifenóis que se encontra presente na forma de flavonóides. As couves portuguesas, e mais uma vez a couve-galega inclusive, apresentam uma fração de flavonóides superior aos 80 % referidos anteriormente, sendo que 95 % dos compostos fenólicos totais são flavonóides (Ferioli, 2013).

2.3.4. Efeito na Saúde

Apesar do conhecimento que existe junto dos consumidores quanto aos benefícios de saúde que os vegetais trazem, poucos são os que sabem que compostos ao certo são responsáveis por essas características ou até de que forma os constituintes da fruta e legumes permitem uma manutenção ou melhoria da saúde humana.

Os consumidores começam agora a tomar conhecimento dos compostos que os beneficiam devido às estratégias de marketing, que cada vez mais recorrem ao uso dos nomes dos constituintes dos alimentos, de forma a demonstrar que é devido a estes que o produto em questão é um alimento saudável.

Sempre de forma muito simplista os mecanismos começam também a ser divulgados, de forma a chamar a atenção do consumidor, muitas vezes associados a esquemas visuais que recorrem a uma linguagem simples e facilmente compreendida pelo consumidor.

Tanto o ser humano como as plantas produzem antioxidantes que vão diminuindo o efeito maligno das espécies reativas nos seus tecidos. Para os seres

humanos uma proteção extra é o consumo de fruta e legumes, de forma a haver um aproveitamento dos compostos antioxidantes de origem vegetal.

Um dos alimentos que podem ajudar a colmatar as necessidades antioxidantes do ser humano é a couve-galega, devido aos seus compostos com capacidade antioxidante, sendo que estudos demonstram uma perda dessa capacidade com o processamento térmico, devendo por isso ser consumida preferencialmente crua (Prior, 2000). Atualmente regista-se um aumento da incidência de doenças crónicas como o cancro, diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, hipercolesterolemia, obesidade, Alzheimer e cataratas. Este incremento está intimamente relacionado com alterações ao estilo de vida, definido pelo aumento do consumo de alimentos com menor valor nutricional e maior valor energético e pela diminuição da atividade física (Gonçalves, 2007).

Todas estas mudanças levam a um aumento do *stress* oxidativo, quer por aumento das espécies reativas como por diminuição do consumo de compostos com atividade antioxidante. Tudo isto, acrescido de fatores genéticos e ambientais, como a poluição, levam ao aumento da ocorrência de mais casos das doenças referidas anteriormente (Korantzopoulos, 2003).

De forma a combater todos estes problemas de saúde que estão relacionados com o *stress* oxidativo, várias organizações promotoras de saúde aconselham o consumo elevado de frutas e legumes.

Em 2010, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América publicou guias dietéticos nos quais aconselhou o consumo de 9 porções diárias de fruta e legumes. Nesse mesmo ano estimava-se que os americanos consumiam em média 3,6 porções diárias de fruta e legumes (Liu, 2013).

Um estudo demonstrou que o consumo de pelo menos 3 porções de fruta ou legumes diminui em cerca de 27 % a mortalidade por doenças cardiovasculares, comparativamente ao consumo de apenas uma porção diária (Liu, 2013).

Os compostos fenólicos têm demonstrado possuir propriedades anticancerígenas, antioxidantes e de inibição da agregação plaquetária (Asami, 2003; Kris-Etherton, 2002).

Dentro destes os flavonóides mostram estar inversamente relacionados com a incidência de doenças cardíacas, sendo que um consumo de aproximadamente 30 mg

diárias de flavonóides diminui em 50 % o risco deste tipo de doenças quando comparado com um consumo inferior a 19 mg por dia (Kris-Etherton, 2002).

Os flavonóides têm um papel muito importante na carcinogénese, atuando em várias fases do desenvolvimento cancerígeno, interrompendo-o. Pensa-se que esta atividade anticancerígena dos flavonóides ocorra devido a efeitos protetores do ADN contra danos oxidativos (Kris-Etherton, 2002).

A saúde dos consumidores é também favorecida pela atividade anti-inflamatória da maioria dos fitoquímicos, visto que a inflamação é um fator de extrema importância para as doenças cardiovasculares (Liu, 2013).

Uma das dietas que demonstra ter efeitos protetores contra várias doenças crónicas é a dieta mediterrânica, devido ao elevado consumo de fruta e legumes, azeite, peixe e os seus derivados e baixo consumo de gorduras saturadas e *trans* (Grosso, 2014; Saura-Calixto, 2009). Esta escolha de uma variedade de alimentos de origem vegetal permite uma ingestão maior e mais variada de compostos com propriedades antioxidantes e protetoras da saúde humana (Saura-Calixto, 2009).

Recentemente, investigadores da Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto (FCNAUP) publicaram a roda da Alimentação Mediterrânica (Rodrigues, 2016). Nesta roda, representada na Figura 5, são evidenciados os alimentos constituintes da dieta mediterrânica mais relacionados com o padrão português, entre eles a couve-galega, que faz parte do grupo dos hortícolas.

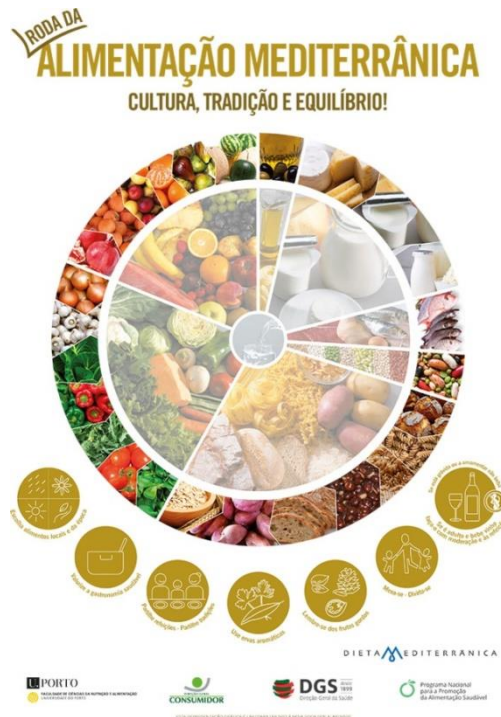


Figura 5 - Roda da Alimentação Mediterrânica (Rodrigues, 2016)

Para além da redução da incidência das doenças crónicas já referidas outras associações têm vindo a ser feitas em relação à dieta mediterrânica. Uma relação inversa entre a dieta mediterrânica e o índice de massa corporal foi obtido em alguns estudos, sendo que esta associação é pouco sustentada cientificamente (Grosso, 2014).

O estudo de padrões alimentares na sua globalidade tem demonstrado efeitos benéficos superiores a estudos que avaliam apenas um composto isolado. Isto demonstra que é o efeito sinérgico existente entre os vários compostos constituintes da matriz do alimento que lhe conferem efeitos promotores da saúde, devendo por isso ser preferido o consumo de uma dieta variada, especialmente em fruta e legumes, ao consumo de suplementos dietéticos (Grosso, 2014).

2.4. PRODUTOS FRESCOS PRÉ-CORTADOS

Nos últimos tempos tem-se registado um aumento da procura de produtos de origem vegetal, consequente da consciencialização dos benefícios para a saúde que este tipo de produtos fornece (Meireles, 2016). Várias organizações focadas na divulgação e incentivo de um estilo de vida saudável recomendam o consumo de mais fruta e legumes como forma de proteção contra várias doenças degenerativas (Allende, 2006; Odriozola-Serrano, 2008; Robles-Sánchez, 2009; Sillani, 2015).

Apesar do esforço por parte dos consumidores para enriquecer a sua alimentação preferindo vegetais, nem sempre isso é possível. Devido a um ritmo de vida acelerado, onde o tempo despendido para cozinhar é pouco (Maffei, 2016; Odriozola-Serrano, 2008), este tipo de produtos é, por vezes, substituído por outros com menor valor nutricional e menos benefícios. Surge a necessidade de criar produtos de origem vegetal que sejam, para além de intrinsecamente saudáveis, também sejam convenientes (Allende, 2006; Maffei, 2016; Odriozola-Serrano, 2008).

Associado aos produtos vegetais está a sua frescura. Esta é uma das características sensoriais que mais rapidamente é perdida durante o período que vai desde a colheita ao seu consumo, sendo que quanto mais tempo passar entre estas duas fases, menor será a aceitação do produto por parte do consumidor.

Têm surgido alternativas que permitem criar produtos vegetais que possam, simultaneamente, reter a frescura do produto e ser convenientes para o consumo (Sillani, 2015). Uma das formas é recorrer ao processamento mínimo, uma técnica na qual o alimento passa pelo menor processamento possível para manter o seu valor nutricional e a sua qualidade sensorial, sem recurso a tratamento térmico (Odriozola-Serrano, 2008; Sillani, 2015). Este processamento pode passar por várias fases como a triagem, descasque, aparamento, corte, fatiamento, desinfeção, secagem e embalagem (Allende, 2006; Maffei, 2016).

Esta técnica permite criar produtos que requerem pouco ou nenhum tratamento por parte do consumidor antes do seu consumo, indo assim de encontro às exigências do consumidor por produtos convenientes. Uma vez que não recorre ao tratamento térmico é um produto que sensorialmente, em particular visualmente, retém a frescura associada aos vegetais (Sillani, 2015).

Um dos problemas associados a este tipo de produtos é o tempo de prateleira limitado, uma vez que são produtos facilmente perecíveis (Robles-Sánchez, 2009). Etapas como o corte ou o descasque vão causar a quebra de células, e por consequência, a libertação de produtos intracelulares como enzimas que atuam ao nível dos tecidos vegetais, tornando o produto mais suscetível à degradação e levando a uma diminuição do tempo de prateleira, quando comparado com os produtos intactos (Allende, 2006; Fonseca, 2002). Ocorre também um aumento da taxa de transpiração, que tornam o produto mais suscetível à perda de qualidade e ao crescimento microbiano (Caleb, 2013).

Várias técnicas alternativas têm vindo a ser estudadas de forma a evitar não permitir uma degradação tão rápida dos produtos frescos minimamente processados (Allende, 2006). Uma nova técnica que tem ganho alguma popularidade é o corte do produto quando este está imerso em água. A água vai criar uma barreira junto à superfície de corte, impedindo que os fluidos presentes no produto (que contêm enzimas oxidativas, por exemplo) possam ser libertados (Allende, 2006). Outra técnica de corte é o recurso a jatos de água a pressões muito elevadas como ferramenta de corte, evitando assim o contacto do produto com o instrumento (Allende, 2006). Caso nenhuma destas técnicas possa ser utilizada é aconselhado o uso de facas e lâminas muito afiadas e de aço inoxidável de forma a evitar causar dano superior ao necessário (Allende, 2006).

O tempo de prateleira pode também ser aumentado recorrendo a temperaturas de processamento, embalagem e armazenamento baixas e a técnicas complementares que permitiram reduzir a degradação de características sensoriais como a cor, a textura e o sabor (Allende, 2006; Fonseca, 2002; Robles-Sánchez, 2009). O recurso a embalagens de atmosfera modificada é importante de forma a controlar a taxa de respiração do produto e o uso de antioxidantes de forma a permitir o controlo do acastanhamento do produto, assim como a inibição das enzimas responsáveis por esta alteração de cor são práticas que também podem ser aplicadas no processamento mínimo de vegetais (Allende, 2006; Robles-Sánchez, 2009).

2.5. DESINFEÇÃO

Um dos problemas associados ao processamento mínimo é o crescimento de microrganismos patogénicos e/ou deteriorativos do produto, uma vez que neste tipo de processamento mínimo não é possível aplicar um tratamento térmico que os elimine. É por este motivo que se tem verificado um elevado número de surtos de doenças de origem alimentar associados a produtos de origem vegetal (Maffei, 2016). Os microrganismos mais associados a surtos causados por vegetais são a *Salmonella spp.*, a *Escherichia coli* O157:H7, seguido de norovirus e de outros microrganismos como *Shigella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Campylobacter spp.* (Faour-Klingbeil, 2016a, 2016b; Meireles, 2016).

Os produtos podem ser contaminados em várias etapas desde o seu crescimento no campo até ao seu consumo, tendo as mais variadas causas, desde o ar, o solo, o uso de estrumes mal compostados, o manuseamento impróprio, a presença de animais domésticos ou selvagens, o armazenamento e/ou embalagem incorreto e o recurso a água contaminada para irrigação ou lavagem dos produtos, sendo este último dos mais importantes (Allende, 2006; Faour-Klingbeil, 2016a, 2016b; Maffei, 2016; Meireles, 2016; Palma-Salgado, 2014).

As superfícies resultantes do corte dos produtos minimamente processados podem servir de abrigo para microrganismos patogénicos e/ou deteriorativos que, através da libertação de substâncias poliméricas extracelulares, criam biofilmes, contaminando assim o produto alimentar (Meireles, 2016). Os biofilmes são uma forma de proteção desenvolvida pelos microrganismos que permite a sua coesão, dificultando a sua remoção de superfícies e alimentos. A contaminação da superfície de corte pode dever-se à contaminação prévia dos vegetais, à utilização de ferramentas de corte contaminadas, ao manuseamento por parte dos operadores ou até mesmo devido ao uso de água contaminada para desinfeção do produto depois do corte (Faour-Klingbeil, 2016a; Meireles, 2016).

Uma forma de prevenir este tipo de contaminação é a lavagem antes e/ou depois do corte (dependendo do produto), permitindo uma redução dos microrganismos patogénicos, como é o caso da *Escherichia coli* O157:H7 (Palma-Salgado, 2014).

A água utilizada tem um grande impacto na segurança do produto final, uma vez que em locais onde o acesso a água potável é escasso é, por vezes, utilizada

água imprópria para irrigação e lavagem dos produtos, causando a contaminação de vegetais, que de outra forma poderiam não ser contaminados (Faour-Klingbeil, 2016b). Esta é a realidade de alguns países do Médio Oriente, onde o número de surtos associados a doenças de origem alimentar causados pelo consumo de vegetais de folhas verdes contaminados é muito grande (Faour-Klingbeil, 2016a, 2016b). Surge então a necessidade de implementar um sistema de desinfeção adequado e de reforçar os esforços que permitam fornecer água potável necessária para uso urbano e rural (Faour-Klingbeil, 2016a, 2016b).

A eficácia da água na remoção da carga microbiana é limitada, sendo necessário recorrer a produtos químicos que auxiliem na desinfeção. Um dos produtos mais utilizados é o cloro, na forma de ácido hipocloroso ou hipoclorito. A sua concentração varia entre 50 e 200 ppm de cloro livre e o tempo de exposição do produto a esta solução não deve exceder os 5 minutos (Meireles, 2016). Este produto químico é utilizado devido ao seu baixo custo, à facilidade de aplicação e ao seu espectro de eficácia antimicrobiana alargado (Berardinelli, 2016; Faour-Klingbeil, 2016a; Maffei, 2016; Meireles, 2016).

Apesar dos benefícios que o uso do cloro traz para a desinfeção este produto atualmente está banido nalguns países da União Europeia, como a Bélgica, a Dinamarca, a Alemanha, a Suíça e a Holanda, devido à sua toxicidade (Berardinelli, 2016; Meireles, 2016). Este composto é capaz de reagir com matéria orgânica produzindo subprodutos tóxicos como o clorofórmio e outros trihalometanos, cloraminas e ácidos haloacéticos (Berardinelli, 2016; Faour-Klingbeil, 2016a; Maffei, 2016; Meireles, 2016; Palma-Salgado, 2014), alterando também algumas características sensoriais do produto (Faour-Klingbeil, 2016a). O cloro apresenta também alguma corrosividade, fazendo parte da lista indicativa de emissões industriais (IPCC), que tem como objetivo reduzir as emissões industriais perigosas (Meireles, 2016).

Surge então a necessidade de recorrer a técnicas e produtos que possuam os benefícios do cloro, sem a sua toxicidade. Uma das práticas a ter sempre em consideração, quer a desinfeção do produto seja efetuada com recurso ao cloro ou a outro desinfetante, é o controlo da temperatura durante todo o processo, desde a colheita até ao consumo, uma vez que este é um fator determinante para o crescimento microbiano. O controlo deve ser efetuado recorrendo à monitorização frequente da temperatura a que o produto está sujeito ou até mesmo ao uso de água

refrigerada, de forma a impedir o crescimento de microrganismos na água utilizada para a desinfecção (Faour-Klingbeil, 2016a; Maffei, 2016; Palma-Salgado, 2014).

Várias alternativas químicas e físicas têm vindo a ser estudadas, de forma a permitir a desinfecção adequada dos produtos frescos minimamente processados. Um dos compostos químicos que apresenta menor reatividade com a matéria orgânica e uma maior estabilidade em água, comparativamente ao cloro, é o dicloroisocianurato de sódio (NaDCC). Este composto é insípido, não alterando o sabor do produto onde está a ser utilizado. A sua eficácia prolongada contribui para a sua aceitação como alternativa ao uso do cloro (Faour-Klingbeil, 2016a; Maffei, 2016).

Outra opção passa pelo recurso a bio-desinfetantes, como o ácido acético ou o ácido cítrico. A sua eficácia na remoção dos microrganismos patogénicos de produtos vegetais é conhecida e são produtos baratos e convenientes, podendo ser utilizados em serviços alimentares e de *catering* para lavar produtos vegetais (Faour-Klingbeil, 2016a).

O gás ionizado é outra alternativa com eficácia comprovada na eliminação de várias bactérias, sendo que é uma técnica que permite o tratamento dos produtos sem alterar a temperatura ou as condições atmosféricas. A sua eficácia varia de acordo com o microrganismo a eliminar, o substrato e as condições elétricas utilizadas para realizar as descargas (Berardinelli, 2016).

Geralmente os produtos minimamente processados são embalados em atmosfera modificada, de forma a aumentar o seu tempo de vida. Como são produtos com características de frescos, continuam a respirar e todos os mecanismos que levam à sua degradação permanecem ativos, sendo por isso necessário controlar a taxa de respiração do produto. Devido ao aumento do tempo de prateleira resultante do uso de embalagem em atmosfera modificada surge o risco do crescimento de bactérias deteriorativas e/ou patogénicas até níveis que afetem a qualidade do produto ou a saúde do consumidor, por isso, os produtos que recorrem a esta tecnologia têm de ser monitorizados mais rigorosamente de forma a garantir que o produto é seguro até o momento do seu consumo (Allende, 2006).

Espera-se que a combinação de várias técnicas, aliadas ao controlo rigoroso quer da temperatura quer de outros fatores que possam contribuir para a aceleração da deterioração dos produtos minimamente processados, seja eficaz para garantir a qualidade e segurança do produto aquando do seu consumo (Allende, 2006). Uma vez que nem todos os produtos sofrem a mesma influência por parte dos fatores externos

e internos é necessário estudar cada caso individualmente, de forma a determinar qual a melhor técnica ou combinação de técnicas de conservação para cada produto em particular (Allende, 2006).

2.6. EMBALAMENTO EM ATMOSFERA MODIFICADA

Especificamente preparada para a confeção do caldo verde, já se encontra à venda couve-galega previamente cortada nas superfícies comerciais e mercados tradicionais. É então que surge a necessidade de minimizar a deterioração da couve-galega, visto que o corte diminui fortemente o seu tempo de vida.

Como medida complementar à cadeia de frio surgiu o embalamento em atmosfera modificada (EAM) (Fonseca, 2002). Estes métodos recorrem a pressões parciais de oxigénio (O_2) baixas e pressões parciais de dióxido de carbono (CO_2) elevadas, evitando perdas de qualidade tão rápidas e ajudando a aumentar o tempo de prateleira do produto (Fonseca, 2005).

Quando o produto é embalado nas condições de O_2 e CO_2 favoráveis à manutenção da sua qualidade ocorre uma diminuição da sua atividade metabólica, reduzido a sua taxa de respiração e inibindo a síntese de etileno, responsável pelo amadurecimento de frutos.

O planeamento do EAM requer conhecimentos em três áreas diferentes, que estudam a fisiologia do produto, o *design* de embalagem e os tipos de filmes poliméricos que podem ser utilizados, mas que se complementam de forma a criar o EAM ideal para certo produto. De forma a conhecer que reações ocorrem no produto e que fatores afetam a sua taxa de respiração, é necessário conhecer a fisiologia do produto em questão (Caleb, 2013).

Outra área com contribuição fundamental nesta técnica é a escolha da embalagem, que trata de estudar qual os melhores filmes, adesivos tintas, entre outros, que devem ser utilizados, assim como o formato ideal da embalagem (mono- ou multicamada) e se deve ou não ser perfurada (Caleb, 2013).

O filme polimérico utilizado para a realização do embalamento é de extrema importância e as suas características, especialmente relacionadas com a sua permeabilidade gasosa, devem ser conhecidas e tidas em conta no planeamento do EAM. A escolha dos filmes poliméricos tem de ter em atenção quais os efeitos causados no produto e na sua atmosfera envolvente. Para além de auxiliar na formação de uma atmosfera adequada à preservação das segurança e das características organoléticas do produto, o polímero serve também de barreira ao

movimento do vapor de água, auxiliando a manutenção da humidade relativa e evitando perdas de peso do produto excessivas (Caleb, 2013).

O filme constituinte da embalagem deve ser adequado de forma a impedir um decréscimo excessivo na humidade relativa e no peso do produto, mas não deverá permitir que a humidade relativa seja alto o suficiente para permitir o crescimento de microrganismos patogénicos e deteriorativos (Caleb, 2013). É necessário então o estudo do polímero que melhor se adequa às características do produto em questão.

Alguns benefícios que advêm do recurso ao embalamento em atmosfera modificada são: (i) retardamento da maturação e posterior senescência; (ii) redução de contaminações por microrganismos e fungos; (iii) controlo de pragas; (iv) atraso no amolecimento de frutas e endurecimento de legumes e (v) diminuição da suscetibilidade à deterioração (Fonseca, 2005).

Apesar de todos os efeitos benéficos associados ao EAM, esta técnica, quando mal planeada, pode proporcionar condições que prejudiquem a qualidade do produto, que é exatamente o oposto do que se pretende com esta tecnologia (Fonseca, 2005). Caso a pressão parcial de O_2 seja demasiado baixa ou a pressão parcial de CO_2 demasiado elevada, criam-se condições de anaerobiose, que beneficiam o crescimento de microrganismos anaeróbicos, prejudiciais à saúde humana e que degradam o produto fresco mais rapidamente. Estas condições podem ainda gerar a produção de álcool e compostos voláteis, causando degradação do produto e perda de qualidade (Sánchez-Mata, 2003).

A temperatura é um fator muito importante a ter em consideração aquando do planeamento das condições de EAM. Desvios de temperatura para fora da gama de temperaturas avaliadas para a cadeia de frio podem causar alterações da atmosfera, levando, por vezes, à criação de uma atmosfera inapropriada e até prejudicial (Caleb, 2013). Daí que esta seja uma técnica complementar da refrigeração, não tendo os efeitos desejáveis caso a temperatura não seja também monitorizada e tida em conta no planeamento.

É necessário um estudo aprofundado de forma a decidir quais as pressões parciais de oxigénio e dióxido de carbono ideais para determinado produto, uma vez que o metabolismo das frutas e legumes varia consoante os alimentos. Sendo assim, diferentes tipos de frutas e legumes irão necessitar de pressões parciais de O_2 e CO_2 diferentes para manter a sua qualidade.

De forma a garantir que o objetivo do EAM é cumprido é necessário ter em atenção o espectro de temperaturas usadas na cadeia de frio durante o projeto do embalamento, por forma a assegurar a qualidade do produto em todos os momentos.

Estudos foram feitos para determinar as melhores pressões parciais de O_2 e CO_2 para o EAM de couve-galega cortada, um exemplo desses estudos é o de Fonseca (2005). Neste estudo foram estudadas várias pressões parciais de O_2 , várias pressões parciais de CO_2 e combinações de pressões parciais dos 2 gases de forma a avaliar os seus efeitos no produto.

O uso de pressões parciais de O_2 baixas permitiu uma redução de alteração de cor, face a amostras armazenadas expostas ao ar, que apresentaram uma cor inaceitável ao fim de apenas 2 dias. Para amostras com baixa pressão parcial de O_2 , a que teve melhores resultados foi a de 1 kPa O_2 , sendo que manteve a cor dentro do desejável por 5 dias. Resultados semelhantes foram obtidos para a avaliação da qualidade visual do produto (Fonseca, 2005). Este é um dos parâmetros mais importantes a avaliar, devido à influência que a cor tem na perceção de qualidade para o consumidor. As amostras expostas ao ar amareleceram ao fim de 2-3 dias, passando a indicar ao consumidor que o produto perdeu qualidade.

Relativamente a odores desagradáveis, estes foram sentidos ao fim de cerca de 2 dias, quer no ar quer para 2 kPa O_2 e 3 kPa de O_2 . A pressão parcial de 1 kPa O_2 aguentou mais um dia sem o aparecimento de odores desagradáveis. Após um dia do aparecimento desses odores em amostras armazenadas ao ar, estes tornaram-se inaceitáveis. Já nas amostras armazenadas em atmosferas com baixas pressões parciais de O_2 , esses odores inaceitáveis só se fizeram sentir ao fim de 4-5 dias (Fonseca, 2005).

Neste estudo o aumento do tempo de vida foi claro para as amostras armazenadas em baixas pressões parciais de O_2 , passando de 2 dias (ao ar) para 3,5 dias em 3 kPa O_2 , 4 dias em 2 kPa O_2 e 4,5 dias em 1 kPa O_2 (Fonseca, 2005).

Os resultados obtidos durante o estudo do efeito de pressões de CO_2 elevadas na couve-galega indicaram também um aumento do tempo de prateleira do produto. Apesar disso, o aumento não foi tão significativo como o das condições anteriores, passando de 2 dias (ao ar) para 3,5 dias em 20 kPa CO_2 (a atmosfera com maior pressão parcial de CO_2 das estudadas). Isto mostra que o aumento da pressão parcial de CO_2 não tem um efeito tão eficaz no aumento do tempo de vida do produto como a

diminuição da pressão parcial de O_2 no que toca ao aumento do tempo de vida da couve-galega cortada (Fonseca, 2005).

O aparecimento de odores desagradáveis aconteceu ao fim de 2 dias para amostras expostas ao ar mas apenas ao fim de 3 dias para amostras em atmosferas com pressões de CO_2 elevadas. Estes odores tornaram-se inaceitáveis para amostras ao ar, a 10 kPa CO_2 , 20 kPa CO_2 e 30 kPa CO_2 ao fim de, respetivamente, 2,7 dias, 3 dias, 4 dias e 4,3 dias (Fonseca, 2005).

Ao contrário do que aconteceu no ensaio anterior, em que ocorreu o amarelecimento do produto, neste caso a couve-galega ficou acastanhada, mostrando que o oxigénio poderá ter inibido o acastanhamento oxidativo do produto (Fonseca, 2005).

O estudo da combinação de pressões parciais de O_2 baixas e de CO_2 elevadas permitiu concluir que a cor é o atributo mais beneficiado pela combinação das duas condições anteriores, visto que apenas as amostras armazenadas em contacto com o ar mostraram diminuição de qualidade devido a alterações de cor (Fonseca, 2005).

O tempo de vida da couve-galega quando em condições de baixo oxigénio e elevado dióxido de carbono foi semelhante ao ensaio em que a mesma foi exposta a pressões parciais de O_2 baixas. Apesar de tudo o fator limitante nesta situação foi o odor desagradável, mostrando que a degradação neste caso ocorre por outro mecanismo, diferente do que leva à degradação em atmosferas com pressão parcial de O_2 baixa (Fonseca, 2005).

Este tipo de estudos deve ser efetuado com regularidade, uma vez que as características do produto podem alterar-se, dependendo de fatores como a altura de colheita, a origem geográfica, o tipo de solo, entre outros.

Surge a necessidade de uma interligação constante entre a indústria alimentar e a engenharia agronómica, com o objetivo de uniformizar e otimizar as características de certo produto embalado em AM, de forma a ser definido corretamente o procedimento e os materiais que proporcionam o maior aumento do tempo de vida possível.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Estudo I – Avaliação do teor em compostos bioativos e parâmetros de qualidade ao longo do processamento mínimo de couve-galega

O procedimento experimental está dividido pela preparação das amostras, medição da taxa de respiração do produto, determinação dos parâmetros de cor, a perda de água, determinação da atividade antioxidante, teor em compostos fenólicos e em flavonóides.

Preparação das amostras

As folhas de couve-galega foram colhidas num produtor local em Vairão, Vila do Conde, na manhã do próprio dia da experiência.

O laboratório foi mantido a uma temperatura constante refrigerada, recorrendo a um sistema de ar condicionado e foram aplicadas boas práticas de higiene durante todo o processamento da couve.

Após a remoção do veio central e zonas estragadas com faca afiada, as folhas foram finamente cortadas (1,2 mm de espessura) utilizando um cortador elétrico Robot Coupe CL 50 Ultra, recorrendo a uma lâmina rotativa. Três amostras de folhas cortadas não higienizadas foram separadas para determinação da cor e teor de água como descrito de seguida e outras 3 amostras (90 g) foram congeladas para determinação posterior dos seus compostos bioativos.

As folhas cortadas para serem higienizadas foram mergulhadas num banho clorado durante 1 minuto a baixa temperatura. O banho de higienização (V = 5 L) tinha sido acabado de preparar, cuja concentração era de 200 ppm. De seguida foram escurridas e centrifugadas num escurridor de saladas. As folhas cortadas e higienizadas foram colocadas em frascos de vidro de 1,9 L, com aproximadamente 300 g de peso e estes por sua vez armazenados em câmaras frigoríficas a diferentes tempos (2 ou 24 h) e temperaturas (2 °C, 10 °C e 20 °C), com 3 frascos para cada combinação tempo/temperatura. No fim dos respetivos tempos de armazenamento foram retiradas amostras de cada frasco para determinação da cor e teor de água. A

determinação da taxa de respiração foi realizada durante o armazenamento nas primeiras duas horas para cada temperatura e réplica (frasco).

Medição taxa de respiração

A determinação da taxa de respiração da couve-galega foi efetuada pelo sistema fechado, recorrendo ao equipamento PBI Dansensor, modelo CheckMate 9900. Estas medições foram realizadas no primeiro dia durante as primeiras duas horas nas amostras armazenadas sob temperatura controlada (2, 10 e 20 °C) em 3 frascos para cada temperatura.

Para dar início à determinação, os frascos com a couve pesada foram fechados e isolados com fita isoladora, tendo-se medido a composição gasosa da sua atmosfera recorrendo a um medidor de gases PBI Dansensor CheckMate 9900, no qual a agulha retirou a atmosfera do interior do frasco através de um septo de borracha na tampa. Os frascos foram de seguida colocados nas respetivas câmaras e retirados com intervalos de 15 min para nova medição da composição da atmosfera no interior do frasco.

Com intervalos de 30 min até perfazer 2 h os frascos foram retirados das câmaras, mediu-se a composição gasosa da atmosfera e voltaram a ser colocados nas câmaras.

Após 2 h retiraram-se amostras para as determinações de cor e teor de água, bem como cerca de 90 g de cada frasco foi colocado num saco de congelação para realizar as medições posteriormente da atividade antioxidante, teor em compostos fenólicos e em flavonóides.

Antes de serem efetuados os cálculos, a massa volúmica da couve-galega foi determinada, por variação do volume de água obtido após a imersão de uma dada massa de couve-galega. Várias medições foram efetuadas, utilizando-se o seu valor médio para o cálculo do volume de couve utilizado em cada frasco. Esse volume foi subtraído ao volume total dos frascos, medido experimentalmente, obtendo-se o volume livre (VL).

Foi calculado para cada amostra e ao longo do tempo os valores de taxa de consumo de O₂ (RO₂, mL.kg⁻¹.h⁻¹), taxa de produção de CO₂ (RCO₂, mL.kg⁻¹.h⁻¹) e quociente respiratório (RQ), utilizando as equações 1, 2 e 3:

$$RO_2 = \frac{\left(\frac{y_{O_2}^i - y_{O_2}^f}{100}\right) * V_L}{m * (t_f - t_i)} \quad \text{Equação 1}$$

$$RCO_2 = \frac{\left(\frac{y_{CO_2}^f - y_{CO_2}^i}{100}\right) * V_L}{m * (t_f - t_i)} \quad \text{Equação 2}$$

$$RQ = \frac{RCO_2}{RO_2}, \quad \text{Equação 3}$$

Sendo,

$y_{O_2}^i$ – concentração volumétrica de O_2 no tempo inicial (%v/v)

$y_{O_2}^f$ – concentração volumétrica de O_2 no tempo final (%v/v)

$y_{CO_2}^i$ – concentração volumétrica de CO_2 no tempo inicial (%v/v)

$y_{CO_2}^f$ – concentração volumétrica de CO_2 no tempo final (%v/v)

V_L – Volume livre (mL)

m – massa de produto (kg)

t_i – tempo inicial (h)

t_f – tempo final (h)

Medição dos parâmetros de cor

Para a couve cortada não higienizada e após higienização, bem como para a couve armazenada em cada combinação de tempo (2 ou 24 h) e temperatura (2, 10 e 20 °C) foram retiradas 3 amostras, uma de cada frasco, colocadas em caixas petri, e medido os parâmetros de cor em cinco pontos diferentes, utilizando um colorímetro Chroma Meter CR-400 da Konica Minolta. Os parâmetros de cor medidos foram CIE L^* , a^* e b^* . Esses valores foram posteriormente utilizados para calcular a diferença de cor total (TCD) das amostras, segundo a equação 4:

$$TCD = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2} \quad \text{Equação 4}$$

Sendo L_0 , a_0 e b_0 os valores medidos para a amostra de 0h não higienizada.

Medição do teor de água

Para a couve cortada não higienizada e após higienização, bem como para a couve armazenada em cada combinação de tempo (2 ou 24 h) e temperatura (2, 10 e 20 °C) foi medido o teor de água de 3 amostras, uma de cada frasco. As amostras pesadas foram colocadas em caixas petri na estufa a 75 °C durante 24 h. Decorrido esse tempo foram retiradas da estufa, arrefecidas e novamente pesadas. O cálculo do teor de água teve por base a equação 5:

$$\text{Teor água (\%)} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) * 100 \quad \text{Equação 5}$$

Sendo,

m_i – massa inicial (g)

m_f – massa final (g)

Análise de compostos bioativos e caracterização da atividade antioxidante

Preparação dos extratos

A determinação do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e a caracterização da atividade antioxidante foi efetuada em extratos metanólicos das 3 amostras previamente congeladas, para cada combinação de tempo/temperatura testada. Para isso, em primeiro lugar procedeu-se à homogeneização de cerca de 45 g de couve de cada réplica, triturando as folhas numa picadora da marca Moulinex.

Para preparação do extrato, foram utilizadas 3 g de amostra (descongelada) e adicionaram-se 20 mL de solução de metanol 80%. Agitou-se a mistura durante 15 min ao abrigo da luz, de forma a garantir uma boa dispersão da amostra no solvente de extração. Para facilitar a extração colocou-se a mistura num banho de ultra-sons durante mais 15 min. De forma a separar o extrato dos resíduos sólidos foi realizada uma centrifugação a 5000 rpm durante 20 min. Após isso o sobrenadante foi filtrado, sendo o extrato congelado em frascos de vidro, mantendo o menor contacto com a luz possível, de forma a evitar a degradação dos compostos pela luz. Esta extração foi efetuada para cada uma das réplicas obtidas.

Determinação dos compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) com algumas modificações (Alves, 2010). A reação foi realizada em microplaca e foi feita em triplicado. Em cada poço foi adicionado 30 μ L de amostra, padrão ou branco, sendo de seguida adicionado 150 μ L de solução Folin (1:10) e 120 μ L de solução NaCO_3 7,5%. A placa foi incubada durante 15 minutos a 45°C, sendo deixada a arrefecer posteriormente. Por último foi feita a leitura da absorvência a 765 nm (Synergy HT, Biotek Instruments, Inc., EUA). A quantificação do teor de compostos fenólicos totais foi obtida através da construção de uma curva de calibração com 7 concentrações diferentes de ácido gálico (linearidade da reação: 5 - 100 mg/L, $r^2 > 0,9854$) e os resultados foram apresentados em mg de ácido gálico/g de amostra fresca.

Determinação de flavonóides

O conteúdo de flavonóides foi determinado por um método espectrofotométrico de acordo com Alves (2010), que monitorizou a formação de um complexo corado de flavonóides-alumínio. A reação foi obtida através da adição de 30 μ L do extrato de amostra, padrão ou branco, 75 μ L de água e 45 μ L de NaNO_2 1%, sendo deixado a reagir durante 5 min. Ao fim desse tempo foram adicionados 45 μ L de AlCl_3 5% e aguardou-se mais 1 min. De seguida, adicionaram-se mais 60 μ L de NaOH 1M e 45 μ L de água, sendo lida, seguidamente, a absorvência a 510 nm, utilizando o leitor de microplacas Synergy HT Microplate Reader(BioTek Instruments, INC., EUA). Para a quantificação foi construída uma curva de calibração com sete concentrações da solução padrão de catequina (linearidade da reação: 5 - 300 mg/L, $r^2 > 0,9988$). Este ensaio foi realizado em triplicado para cada solução de padrão e para cada extrato. Os resultados foram apresentados em mg de catequina/g de amostra fresca.

Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)

A avaliação da capacidade de sequestrar radicais de DPPH• dos extratos da couve-galega foi efetuada de acordo com o método descrito em Santos, (2014) com ligeiras modificações. O ensaio de eliminação do radical 2,2difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) foi realizado directamente nos poços de uma microplaca de 96 poços. Nos

poços colocaram-se 30 µL de amostra/padrão/branco e 270 µL de solução metanólica de DPPH• (9,5 x 10⁻⁵ mol/L). A evolução da reação foi monitorizada a 517 nm (Synergy HT Microplate Reader, BioTek Instruments, INC, EUA) de 3 em 3min durante 1 h 30 min. A curva de calibração foi efetuada com o trolox (linearidade 2,2-16,8 mg/L, r² >0,9821).

Os resultados foram apresentados em mg equivalentes de trolox/g de amostra fresca.

Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)

Nesta análise monitorizou-se a capacidade dos extratos de couve-galega para reduzir o complexo de ferro férrico tripiridiltiazina (Fe⁺³-TPTZ) a um complexo de ferro ferroso tripiridiltiazina (Fe⁺²- TPTZ) a pH 3,6. O método FRAP foi efetuado de acordo com Benzie and Strain (1999) com pequenas modificações (Santos, 2014). O ensaio FRAP foi realizado diretamente em microplaca com 96 poços, adicionando-se 265 µL de reagente FRAP (10:1:1 de 300 mmol/L tampão acetato de sódio (pH 3,6): solução 10 mmol/L TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina): solução 20 mmol/L FeCl₃•6H₂O) e 35 µL de extrato aos poços da placa. A absorvência da reação foi lida a 595 nm no Synergy HT Microplate Reader (BioTek Instruments, EUA). A curva de calibração teve por base uma solução de sulfato ferroso (linearidade 25-500 µM, r²>0.9977), sendo os resultados expressos em mmol de sulfato ferroso por g de amostra fresca.

Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Radical ABTS•+

A capacidade dos extratos para eliminar radicais de ABTS+ foi determinada utilizando o método descrito por Plaza (2010). Em primeiro lugar procedeu-se à preparação de uma solução que continha o radical ABTS+ (3,5 mM). Para isso fizeram reagir uma solução aquosa de ABTS (7 mM) com igual volume de uma solução de persulfato de potássio (2,45 mM). Esta solução de ABTS •+ (3,5 mM) foi preparada no dia anterior à análise e deixada a estabilizar durante a noite à temperatura ambiente e protegida da luz. No dia seguinte, a solução de ABTS •+ (3,5 mM) foi diluída com tampão fosfato 5mM (pH7,4) até possuir uma absorvência de 0,7 (±0,02) a 734 nm. Esta foi a solução utilizada para avaliar a capacidade antioxidante presente nas amostras. Adicionou-se 1mL de solução ABTS estabilizada a 10 µL de extrato das amostras. Foram, posteriormente, passados 300 µL desta reação para uma microplaca

de 96 poços. Realizou-se a leitura da absorvência a 734 nm durante 90 minutos (intervalos de 3 minutos) de forma a registar a evolução da inibição do radical ABTS.

A reta de calibração (linearidade 27-550 mg/L, $r^2 > 0.9985$), foi feita recorrendo a uma solução de trolox (550 mg/L), tendo sido os resultados apresentados em mg equivalentes de trolox /g produto fresco.

Tratamento estatístico de dados

O efeito da higienização e do tempo e da temperatura de armazenamento no teor de água, na cor, no teor em compostos fenólicos totais, no teor em flavonóides, na atividade antioxidante e na taxa de consumo de O₂ e taxa de produção de CO₂ foi avaliado recorrendo aos respectivos intervalos de confiança a 95%.

3.2. ESTUDO II - Influência do tempo e temperatura na taxa de respiração de couve-galega minimamente processada

Após análise dos resultados obtidos da taxa de respiração no Estudo I, realizou-se uma segunda experiência, com o objetivo de efetuar medições mais regulares, de forma a ter uma melhor descrição das alterações que ocorrem na taxa de respiração nas primeiras horas e ao longo do tempo de vida do produto, bem como durante mais de 24 h.

O procedimento experimental neste estudo é semelhante ao do estudo I, sendo que as medições de atmosfera (O₂ e CO₂) foram efetuadas de 15 em 15 minutos durante a primeira hora, de 20 em 20 minutos na segunda hora e ao fim de 23 h 30 min, 24 h, 24 h 30 min, 47 h 30 min, 48 h e 48 h 30 min. Os frascos foram semiabertos no fim de cada dia de amostragem e novamente fechados no dia seguinte durante os 30 min de medição.

Tratamento estatístico de dados

O efeito do tempo e da temperatura de armazenamento na taxa de consumo de O₂ e taxa de produção de CO₂ foi avaliado pelos respectivos intervalos de confiança a 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo I

Medição taxa de respiração

Os resultados obtidos neste primeiro estudo estão apresentados nas figuras 6 e 7. Como é possível observar os valores da taxa de consumo de O_2 (RO_2) e da taxa de produção de CO_2 (RCO_2) mostraram uma tendência de decréscimo com o tempo, como era esperado. Uma vez que, à medida que há um consumo de O_2 presente no frasco, a concentração deste disponível para a respiração da couve-galega diminui, levando consequentemente à diminuição da produção de CO_2 por parte das couves.

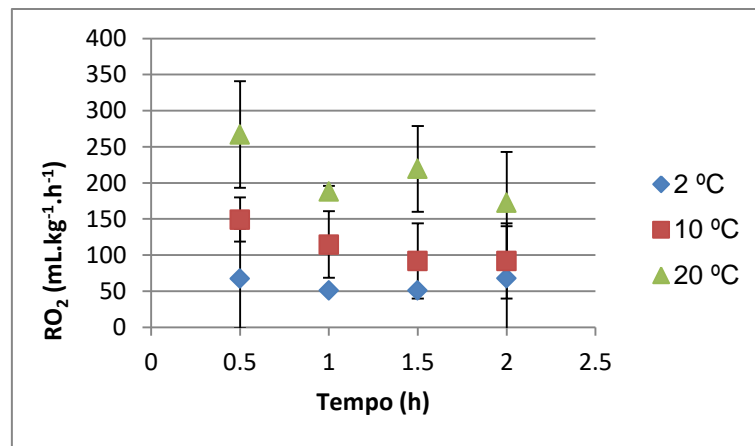


Figura 6 - Taxa de consumo de O_2 ($mL.kg^{-1}.h^{-1}$) de couve-galega cortada ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}C$) de armazenamento. Pontos são média de 3 réplicas e barras intervalo de confiança a 95 %.

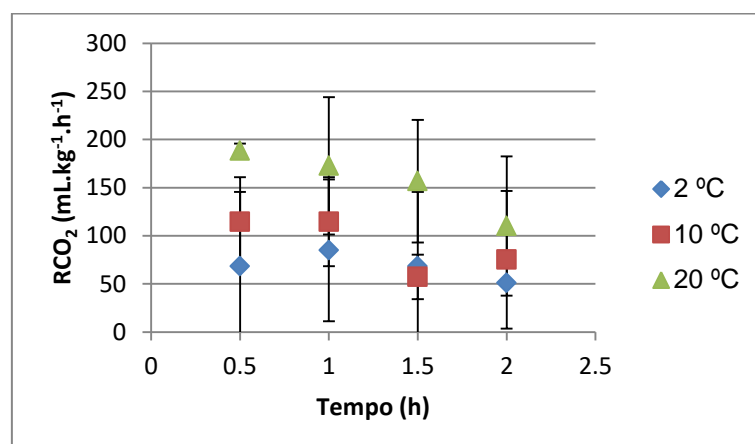


Figura 7 - Taxa de produção de CO_2 ($mL.kg^{-1}.h^{-1}$) de couve-galega cortada ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}C$) de armazenamento. Pontos são média de 3 réplicas e barras intervalo de confiança a 95 %.

Os valores de taxa de consumo de O_2 permitem verificar que a amostra armazenada a 20 °C é significativamente diferente das outras duas temperaturas ($p < 0,05$), apresentando os valores de RO_2 mais elevados ($266,8 \pm 29,7 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ao fim de 30min, $188,2 \pm 3,0 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ após 1h, $219,3 \pm 23,9 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ao fim de 1h 30min e $172,7 \pm 28,3 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ após 2h de medições).

As amostras armazenadas a 2 °C e 10 °C aparentam ser diferentes, mas não existe diferença estatística significativa, sendo a amostra armazenada à temperatura inferior a que apresenta os valores de taxa de consumo de O_2 mais baixos ($67,7 \pm 29,1 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para amostras armazenadas a 2 °C ao fim de 2h e $91,9 \pm 21,0 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a amostra armazenada a 10 °C ao fim do mesmo período de tempo).

Relativamente aos valores de RCO_2 , a amostra armazenada a 20 °C é, novamente, a que apresenta os valores mais elevados comparativamente com as outras, mas sem significância estatística ($p > 0,05$), sendo o valor inicial $188,2 \pm 3,0 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e ao fim de 2h, $110,1 \pm 29,2 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. O valor inicial obtido é muito baixo comparativamente com o apresentado no trabalho de Fonseca (2002), no qual o valor inicial da taxa de produção de CO_2 a 20 °C era de $405,5 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Esta variabilidade dever-se-á à dispersão dos resultados obtidos para cada replica.

Os valores de 2 °C e 10 °C apresentam uma relação semelhante à dos valores de RO_2 , havendo uma inversão da relação para os valores relativos ao tempo de 1h 30 min, sendo o valor da amostra armazenada a 2 °C $68,2 \pm 31,2 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e o valor da amostra armazenada a 10 °C $57,3 \pm 9,3 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Os valores de RQ resultantes para a amostra armazenada a 2 °C variam entre $0,8 \pm 0,3$ (entre 1h 30 min e 2h) e $1,7 \pm 0,6$ (entre 0h 30 min e 1h). O facto de se obter um valor superior a 1,3, que geralmente é utilizado para monitorizar se a respiração é anaeróbia, não significa que isso poderá estar a ocorrer, uma vez que foram tomadas medidas preventivas para o evitar, sendo os frascos abertos por um tempo a cada dia de medições. O valor 1,7 poderá ser resultante da dispersão dos resultados obtidos para as várias réplicas.

Para a amostra armazenada a 10 °C os valores de RQ foram mais constantes, havendo apenas variação entre $0,7 \pm 0,3$ (entre 1h e 1h 30 min) e $1,0 \pm 0,0$ (entre 0h 30 min e 1h).

Durante o armazenamento a temperatura mais elevada, os valores de RQ variaram entre $0,6 \pm 0,1$ (na última meia hora de armazenamento) e $0,9 \pm 0,1$ (entre 0h 30 min e 1h de armazenamento).

Medição dos parâmetros de cor

De forma a avaliar as diferenças em termos de cor das várias amostras foi utilizado o parâmetro TCD, que compara os parâmetros L^* , a^* e b^* (Figura 8) de cada uma das amostras com os mesmos parâmetros de um controlo. Neste caso o controlo utilizado foram as amostras que não sofreram nem higienização nem refrigeração.

Tabela 4 - Parâmetros de cor (média \pm desvio padrão) da couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.

Fase	L^*	a^*	b^*	TCD
Após corte (sem higienização)	$38,9 \pm 1,6$	$-9,9 \pm 1,1$	$11,4 \pm 2,0$	-
Após higienização (0 h)	$35,2 \pm 1,6$	$-11,8 \pm 1,7$	$14,6 \pm 3,0$	$3,3 \pm 1,7$
Após 2 h armazenadas a 2 °C	$35,5 \pm 1,8$	$-9,5 \pm 1,3$	$11,2 \pm 2,1$	$5,4 \pm 2,5$
Após 2 h armazenadas a 10 °C	$34,7 \pm 1,8$	$-8,9 \pm 1,2$	$10,3 \pm 2,3$	$5,7 \pm 2,1$
Após 2 h armazenadas a 20 °C	$37,9 \pm 3,1$	$-9,4 \pm 1,1$	$11,4 \pm 2,1$	$5,9 \pm 1,8$
Após 24 h armazenadas a 2 °C	$35,9 \pm 3,7$	$-8,4 \pm 1,1$	$9,7 \pm 1,9$	$7,0 \pm 2,2$
Após 24 h armazenadas a 10 °C	$36,1 \pm 2,1$	$-9,3 \pm 1,0$	$10,8 \pm 2,0$	$5,3 \pm 1,9$
Após 24 h armazenadas a 20 °C	$35,1 \pm 1,8$	$-9,3 \pm 1,8$	$10,8 \pm 2,9$	$5,4 \pm 2,6$

É de notar, recorrendo à Tabela 4 e à Figura 9, que o TCD mais baixo foi obtido para as amostras que apenas foram higienizadas e não refrigeradas ($3,3 \pm 1,7$), sendo que ocorre um aumento desse valor quando comparadas com as restantes amostras.

As amostras que apenas sofreram higienização (0h) são também estatisticamente diferentes das armazenadas a 20 °C durante 2 h. Comparativamente com estas existe um aumento de cerca de 81% do valor do TCD durante o armazenamento.

A outra diferença que é possível detetar (com $p < 0,05$) entre os valores apresentados na Figura 10 é o aumento do valor do TCD para mais do dobro quando as amostras são armazenadas a 2 °C durante 24 h ($7,02 \pm 2,2$), quando comparado com as amostras que apenas são higienizadas ($3,27 \pm 1,7$).

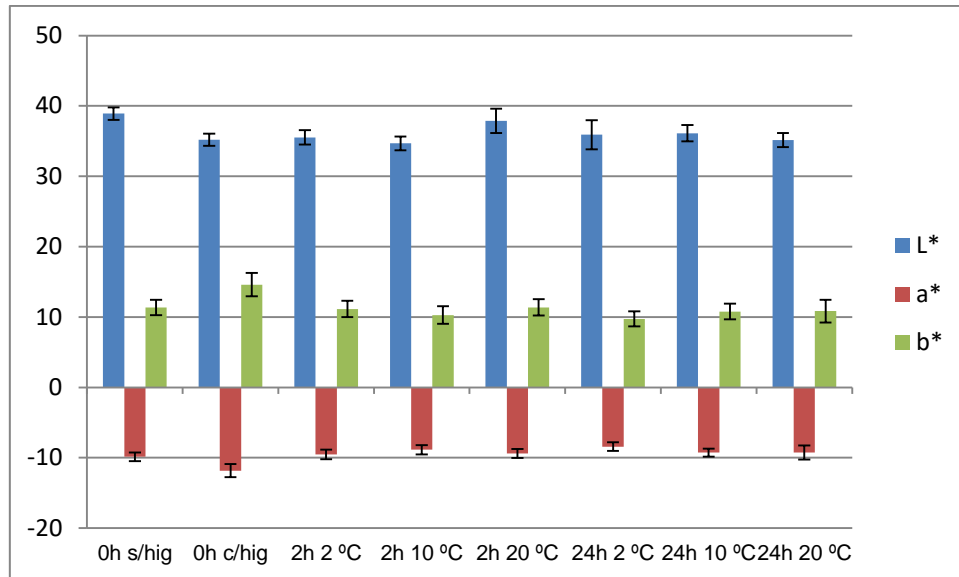


Figura 8 - Parâmetros a^* , b^* e L^* (média \pm intervalo de confiança a 95%) da couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.

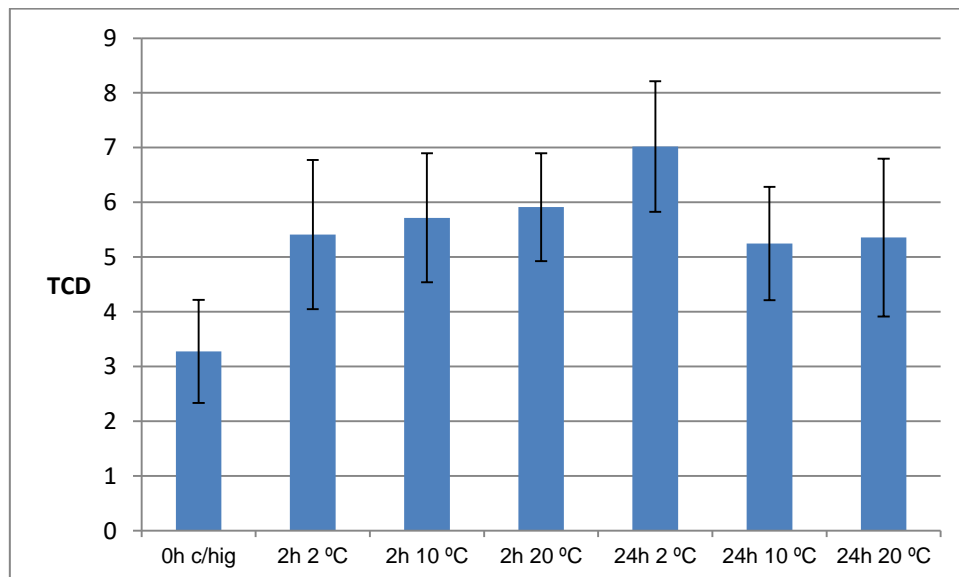


Figura 9 - Valores de TCD (média \pm intervalo de confiança a 95%) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.

Medição do teor de água

Quanto ao teor de água das amostras de couve-galega submetidas a diferentes condições, a Tabela 5 e a Figura 10 mostram que o teor é menor para as amostras que não sofreram higienização utilizando água clorada ($87,55 \pm 0,2$ %, $p < 0,05$) comparativamente com todas as outras amostras exceto com as amostras armazenadas por 2h a 2 °C e a 20 °C. Após a higienização o teor de água aumenta para todas as amostras exceto as referidas anteriormente, mostrando que existe um aumento significativo de quase 3 unidades percentuais devido à higienização, na qual o produto absorve parte da água com que é desinfetado.

Tabela 5 - Teor de água (média \pm desvio padrão) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.

Fase	Teor de água (%)
Após corte (sem higienização)	$87,55 \pm 0,2$
Após higienização	$90,22 \pm 0,2$
Após 2 h armazenadas a 2 °C	$89,21 \pm 0,5$
Após 2 h armazenadas a 10 °C	$89,72 \pm 0,4$
Após 2 h armazenadas a 20 °C	$88,97 \pm 0,7$
Após 24 h armazenadas a 2 °C	$90,05 \pm 0,5$
Após 24 h armazenadas a 10 °C	$89,41 \pm 0,4$
Após 24 h armazenadas a 20 °C	$89,01 \pm 0,2$

Não foi possível concluir se as diferentes condições de armazenamento têm influência no teor de água determinado na couve-galega dado a grande dispersão dos resultados.

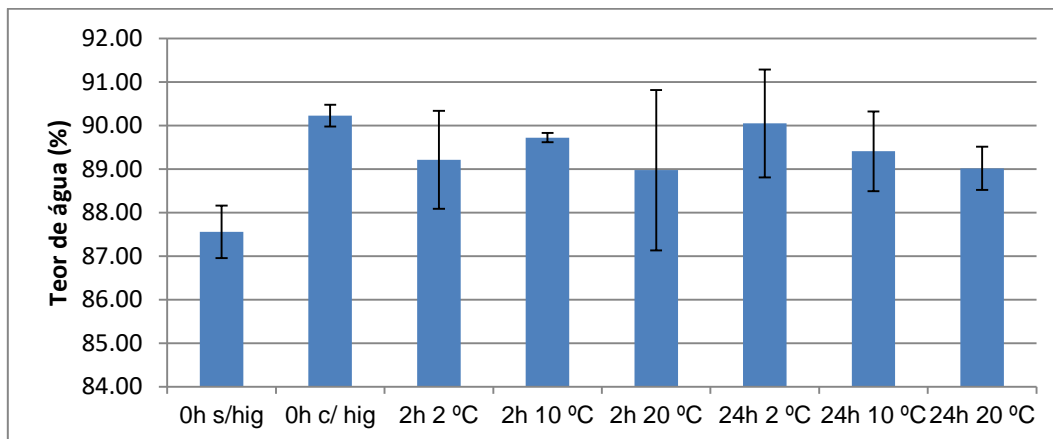


Figura 10 - Teor de água (média \pm intervalo de confiança a 95%) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.

Teor de compostos fenólicos totais

Os resultados obtidos na determinação do teor de compostos fenólicos totais são apresentados na Tabela 6 e Figura 11. O valor mais elevado foi obtido nas amostras que não sofreram higienização, sendo este o único que se diferencia de todos os outros ($1,72 \pm 0,07$ mg ácido gálico/g amostra fresca, $p < 0,05$), mostrando que a higienização provoca uma perda de compostos fenólicos totais nas amostras de couve-galega. Esta perda poderá ser causada por fenómenos de lixiviação, uma vez que a maioria destes compostos são solúveis em água. As perdas obtidas antes de qualquer tipo de armazenamento rondam os 33% do valor sem higienização. Após a higienização ocorre um decréscimo no teor em fenólicos totais da couve-galega ($1,15 \pm 0,09$ mg de ácido gálico/g amostra fresca) e esse valor parece aumentar com o tempo de refrigeração, sendo que não existe significância estatística que o comprove ($p > 0,05$). Durante o armazenamento, os valores mostraram-se mais constantes, podendo manter-se ou diminuir ligeiramente, não sendo registadas mais perdas significativas.

Tabela 6 - Teor em compostos fenólicos totais (media \pm desvio padrão) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.

Fase	mg acido gálico/g amostra fresca
Após corte (sem higienização)	1,72 \pm 0,07
Após higienização	1,15 \pm 0,09
Após 2 h armazenadas a 2 °C	1,27 \pm 0,10
Após 2 h armazenadas a 10 °C	1,30 \pm 0,06
Após 2 h armazenadas a 20 °C	1,15 \pm 0,11
Após 24 h armazenadas a 2 °C	1,20 \pm 0,04
Após 24 h armazenadas a 10 °C	1,41 \pm 0,07
Após 24 h armazenadas a 20 °C	1,45 \pm 0,07

Os valores relativos ao armazenamento durante 24 h a 10 °C e 20 °C são os mais elevados dentro dos que sofreram desinfeção (1,41 \pm 0,07 mg de ácido gálico/g amostra fresca e 1,45 \pm 0,07 mg de ácido gálico/ g amostra fresca respetivamente). O valor obtido para as amostras armazenadas a 20 °C durante 24 h é diferente de todos os valores ($p < 0,05$), excepto os relativos às amostras refrigeradas a 10 °C por 24 h.

O teor em fenólicos totais da amostra não higienizada de couve-galega foi comparado com os valores deste composto presente na couve roxa analisada no estudo de Murador (2016). Este trabalho mostra que a couve-galega apresenta um teor em fenólicos totais 6 vezes superior ao apresentado pela couve roxa (0,2854 \pm 0,0273 mg ácido gálico / g amostra fresca) (Murador, 2016).

Mesmo após a higienização e o armazenamento refrigerado o teor em compostos fenólicos da couve-galega mantém-se muito superior ao teor destes compostos na couve-roxa, sendo uma boa alternativa ao consumo desta última.

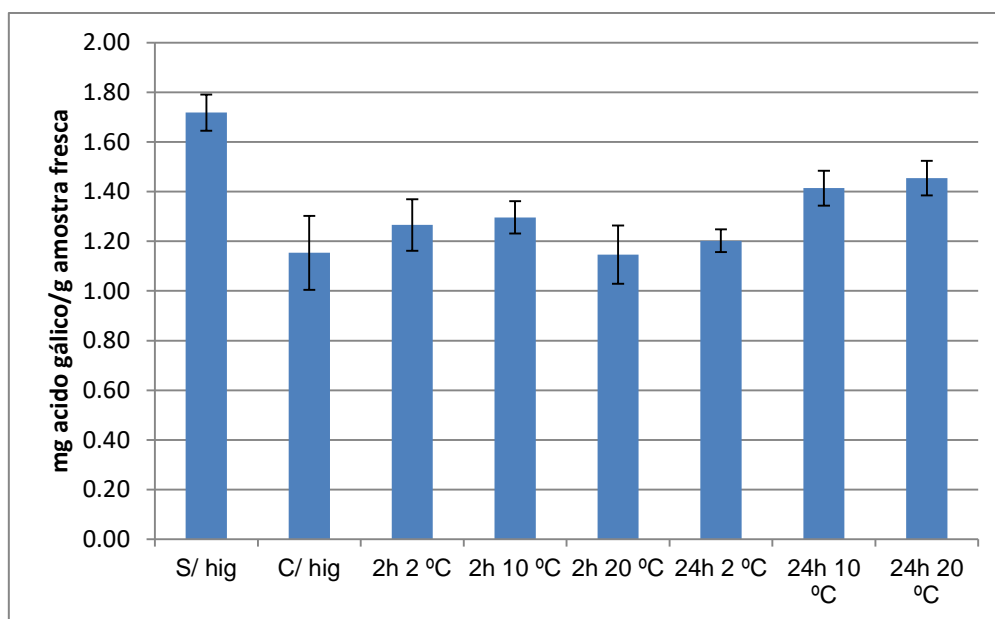


Figura 11 - Teor em fenólicos totais (média \pm intervalo de confiança a 95%) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.

Teor de flavonóides

Relativamente ao teor em flavonóides, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7 e Figura 12. Mais uma vez, foi possível notar que a amostra com teor mais elevado é a que não sofre higienização, mostrando que, mais uma vez, ocorre lixiviação deste tipo de compostos. Devido à higienização cerca de 40% dos flavonóides presentes na couve-galega são perdidos, à semelhança do que acontece com os compostos fenólicos totais.

Tabela 7 - Teor em flavonóides (média \pm desvio padrão) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.

Fase	mg catequina/g amostra fresca
Após corte (sem higienização)	0,30 \pm 0,02
Após higienização	0,18 \pm 0,02
Após 2 h armazenadas a 2 °C	0,24 \pm 0,02
Após 2 h armazenadas a 10 °C	0,24 \pm 0,02
Após 2 h armazenadas a 20 °C	0,21 \pm 0,02
Após 24 h armazenadas a 2 °C	0,18 \pm 0,00
Após 24 h armazenadas a 10 °C	0,20 \pm 0,02
Após 24 h armazenadas a 20 °C	0,26 \pm 0,02

Apesar de ocorrer uma perda considerável devido à higienização, parte do teor desses compostos são parcialmente recuperados durante o armazenamento, especialmente nas primeiras duas horas após o início do armazenamento a 2 °C e a 10 °C. Contudo, comparando diferentes tempos de armazenamento para a mesma temperatura é possível verificar que ocorreu um decréscimo no teor em flavonóides com o tempo para as amostras armazenadas a 2 °C e 10 °C ($p < 0,05$). Já nas amostras armazenadas a 20 °C ocorreu um aumento do teor em flavonóides ($p < 0,05$) no final das 24 h de armazenamento, sendo que esta foi a maior recuperação do teor de flavonóides inicial ($\approx 87\%$ do teor inicial sem higienização).

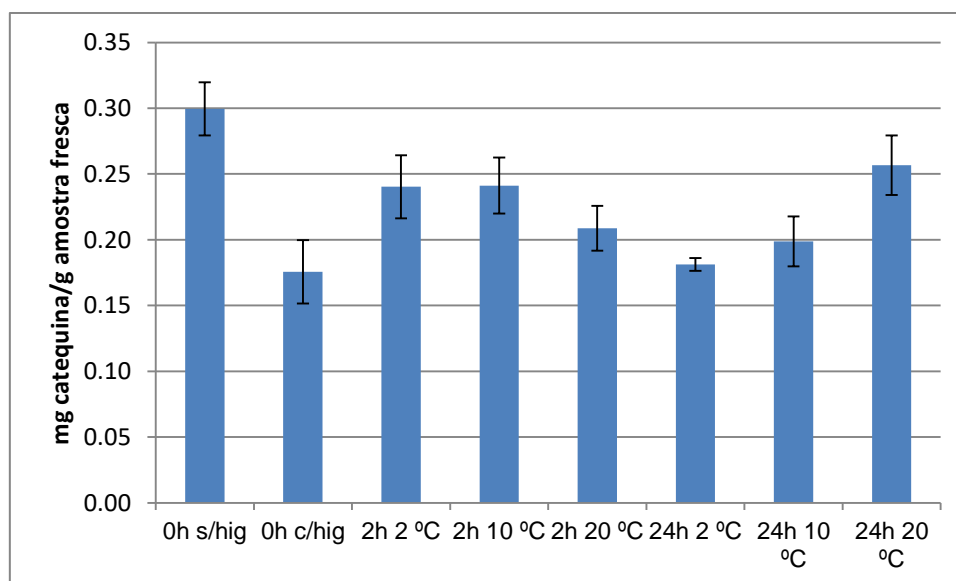


Figura 12 - Teor em flavonóides (média \pm intervalo de confiança a 95%) de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento.

Determinação da atividade antioxidante

Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante dos extratos de couve-galega através do método de DPPH são apresentados na Tabela 8. Este método mostrou que a amostra não higienizada é diferente de todas as outras ($p < 0,05$), com exceção da armazenada durante 2 h a 20°C. Como se pode ver pela Tabela 8 a amostra não higienizada é a que contém um maior valor de mg equivalentes de trolox / g amostra fresca, mostrando por isso uma maior atividade

antioxidante que as restantes amostras, que à lixiviação de compostos verificada anteriormente, mostraram também uma menor atividade antioxidante.

Tabela 8 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento medida sob a forma de mg equivalentes de trolox / g amostra fresca (média \pm desvio padrão) recorrendo ao método DPPH.

Fase	mg eq trolox/g amostra fresca
Após corte (sem higienização)	0,73 \pm 0,06
Após higienização	0,41 \pm 0,04
Após 2 h armazenadas a 2 °C	0,44 \pm 0,04
Após 2 h armazenadas a 10 °C	0,51 \pm 0,04
Após 2 h armazenadas a 20 °C	0,52 \pm 0,08
Após 24 h armazenadas a 2 °C	0,42 \pm 0,05
Após 24 h armazenadas a 10 °C	0,35 \pm 0,08
Após 24 h armazenadas a 20 °C	0,57 \pm 0,08

Contudo, e talvez devido à ligeira recuperação do teor de compostos fenólicos e flavonóides verificada, foi possível ver que a atividade antioxidante dos extratos pareceu recuperar também durante o armazenamento (Figura 13). Porém, isso não ocorre em todas as combinações tempo / temperatura e apenas a amostra armazenada a 20 °C por 24 h é significativamente diferente da amostra que apenas sofreu higienização ($p < 0,05$), tendo ocorrido uma maior aproximação à capacidade antioxidante inicial da couve-galega. Após armazenamento durante 2 h não existiram diferenças entre a atividade antioxidante das amostras. O mesmo ocorreu para as amostras armazenadas a 2 °C e a 20 °C ($p > 0,05$). Já nas amostras armazenadas a 10 °C foi possível notar que estas foram perdendo capacidade antioxidante após as 24 horas de armazenamento, apresentando uma diminuição de cerca de 31% quando comparada com a amostra armazenada por menor período de tempo à mesma temperatura.

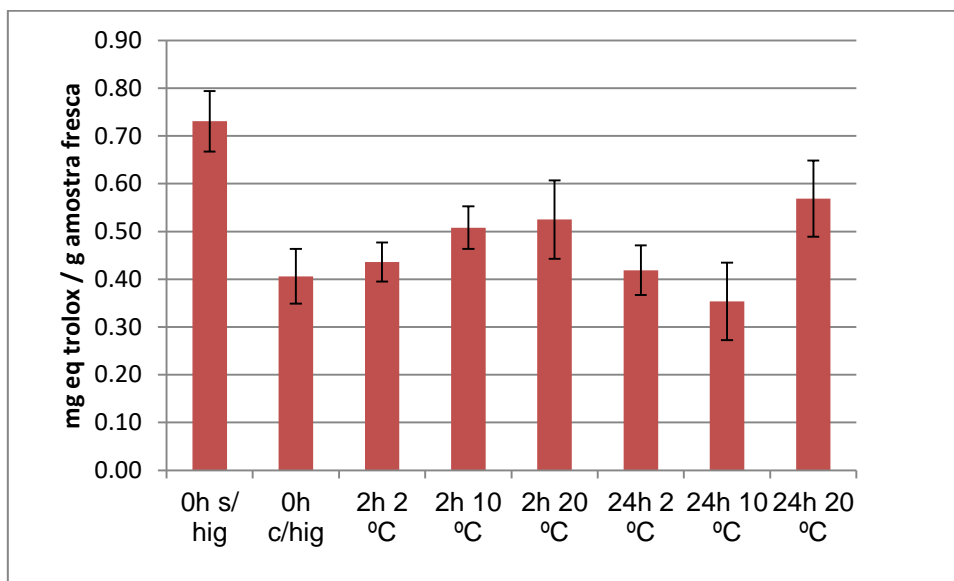


Figura 13 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento sob a forma de mg equivalentes de trolox / g amostra fresca (média ± intervalo de confiança a 95%) pelo método DPPH.

Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

Outro dos métodos utilizados para a determinação da atividade antioxidante da couve-galega foi o método de FRAP. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 9 e mostram, mais uma vez, que a amostra não higienizada apresenta uma atividade antioxidante diferente da higienizada não refrigerada ($p < 0,05$), apresentando um valor 33% inferior ao valor inicial.

Tabela 9 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento medida sob a forma de μmol equivalentes de sulfato ferroso / g amostra fresca (média ± desvio padrão) recorrendo ao método FRAP.

Fase	$\mu\text{mol eq sulfato ferroso/g amostra fresca}$
Após corte (sem higienização)	6,49±0,43
Após higienização	4,35±0,24
Após 2 h armazenadas a 2 °C	5,29±0,61
Após 2 h armazenadas a 10 °C	5,43±0,59
Após 2 h armazenadas a 20 °C	5,26±0,87
Após 24 h armazenadas a 2 °C	4,50±0,34
Após 24 h armazenadas a 10 °C	5,01±0,17
Após 24 h armazenadas a 20 °C	5,64±0,47

Ao longo do armazenamento parece ocorrer uma recuperação da atividade antioxidante da couve-galega, quando comparada com a amostra que sofreu higienização mas não foi armazenada. Isto é demonstrado por ambas as amostras armazenadas a 10°C e pela amostra armazenadas a 20°C por 24h ($p<0,05$), com uma recuperação na ordem dos 15% a 20% da capacidade para reduzir o ferro inicial (Figura 14).

Em geral o teor em μmol equivalentes de sulfato ferroso / g amostra fresca de couve-galega é cerca de 5 vezes inferior ao presente na couve roxa (*Brassica oleracea L. ssp. capitata f. rubra*), que apresenta uma capacidade antioxidante determinada pelo método FRAP de cerca de 24,9 μmol equivalentes de sulfato ferroso / g amostra fresca (Volden, 2008).

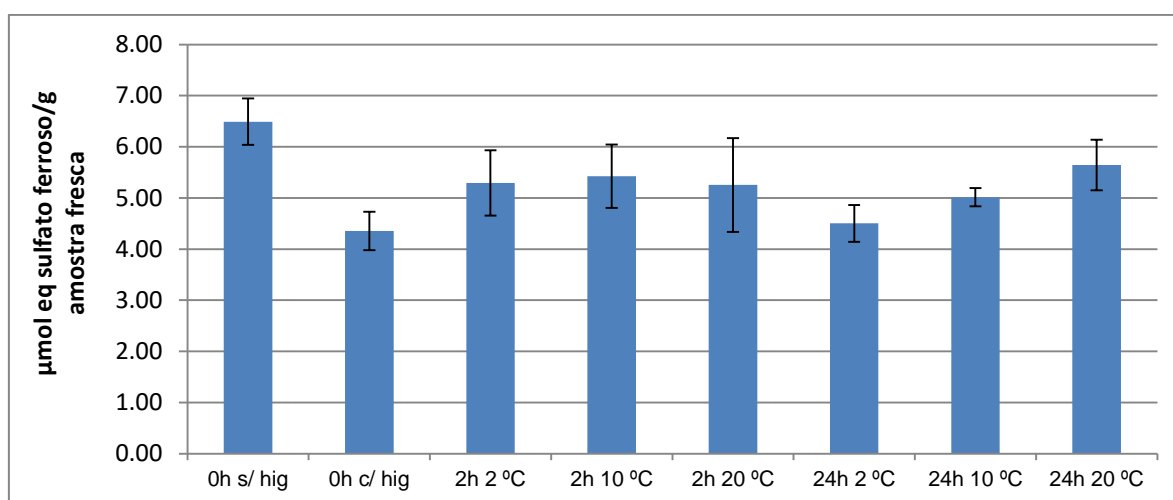


Figura 14 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento sob a forma de μmol equivalentes de sulfato ferroso / g amostra fresca (média \pm intervalo de confiança a 95%) recorrendo ao método FRAP.

Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS

O último método utilizado para a determinação da capacidade antioxidante da couve-galega foi o método ABTS. À semelhança dos dois métodos anteriores, a amostra que não foi higienizada distingue-se das outras com uma capacidade antioxidante maior, sendo que apenas a amostra higienizada e não refrigerada, armazenadas por 2h e a armazenada a 2°C durante 24h são significativamente diferentes da primeira ($p<0,05$), como mostra a Tabela 10.

Tabela 10 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento sob a forma de mg equivalentes de trolox / g amostra fresca (média \pm desvio padrão) recorrendo ao método ABTS.

Fase	mg equivalente de trolox/g amostra fresca
Após corte (sem higienização)	0,034 \pm 0,001
Após higienização	0,023 \pm 0,001
Após 2 h armazenadas a 2 °C	0,021 \pm 0,001
Após 2 h armazenadas a 10 °C	0,026 \pm 0,002
Após 2 h armazenadas a 20 °C	0,026 \pm 0,002
Após 24 h armazenadas a 2 °C	0,023 \pm 0,001
Após 24 h armazenadas a 10 °C	0,031 \pm 0,003
Após 24 h armazenadas a 20 °C	0,033 \pm 0,003

Após a higienização a capacidade antioxidante parece manter-se ou até mesmo ser recuperada durante o armazenamento, sendo que as amostras armazenadas por 24 h a 10 °C e 20 °C são as que se distinguem mais claramente da não refrigerada ($p < 0,05$), ocorrendo recuperação de cerca de 40% da capacidade para reduzir o radical de ABTS registada na amostra fresca (Figura 15).

A amostra armazenada segundo a combinação 2 h/2 °C distingue-se das armazenadas pelo mesmo período de tempo mas a diferentes temperaturas ($p < 0,05$), sendo que as segundas têm cerca de 24% mais capacidade para reduzir o radical de ABTS que a amostra armazenada a 2 °C.

Existem também diferenças significativas entre as amostras armazenadas a 20 °C ($p < 0,05$), sendo que a amostra armazenada durante um maior período de tempo tem 27% mais de capacidade antioxidante do que a armazenada somente por 2 h. Isto poderá ocorrer devido a uma exposição mais prolongada do produto a uma temperatura de armazenamento mais elevada, causando um maior *stress* para a couve-galega que, para se proteger, produz compostos com capacidade antioxidante (Reyes, 2007).

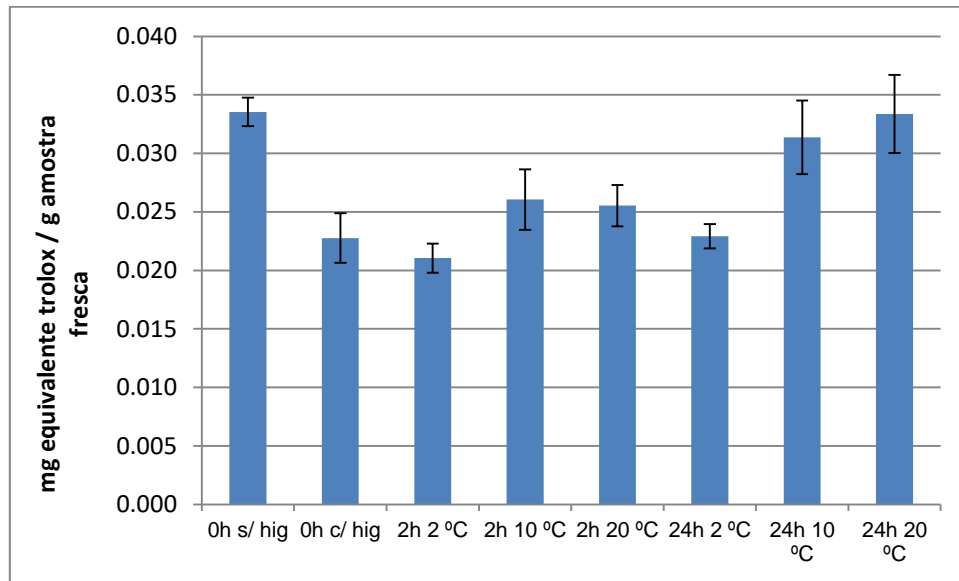


Figura 15 - Capacidade antioxidante de couve-galega submetida a diferentes condições de higienização e armazenamento sob a forma de mg equivalentes de trolox / g amostra fresca (média \pm intervalo de confiança a 95%) recorrendo ao método ABTS.

ESTUDO II

Relativamente aos valores de RO_2 na Tabela 11 e à Figura 16 é possível verificar que ocorre uma diminuição ao longo do tempo para todas as temperaturas avaliadas. Verifica-se ainda que ao longo do tempo começa a ocorrer uma estabilização dos valores ao fim de 24 h para todas as temperaturas, sendo essa estabilização menos notória para a amostra armazenada a 20 °C. Ao fim de 48 h os valores de RO_2 são semelhantes aos do dia anterior ($p>0,05$). Estes resultados estão em concordância com os valores obtidos durante a medição da taxa de respiração no Estudo I.

Tabela 11 - Valores de RO_2 ($mL.kg^{-1}.h^{-1}$) de couve-galega ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}C$) de armazenamento.

Tempo (h)	RO_2 ($mL.kg^{-1}.h^{-1}$)		
	2 $^{\circ}C$	10 $^{\circ}C$	20 $^{\circ}C$
0h – 0h 15 min	143,4 \pm 9,6	160,7 \pm 1,3	182,1 \pm 4,5
0h 15 min – 0h 30 min	84,8 \pm 13,7	156,8 \pm 6,9	182,8 \pm 6,1
0h 30 min – 0h 45 min	47,8 \pm 3,2	137,8 \pm 1,1	197,2 \pm 23,4
0h 45 min – 1h	71,7 \pm 4,8	133,2 \pm 7,9	208,9 \pm 7,0
1h – 1h 20 min	41,4 \pm 8,6	133,6 \pm 4,7	195,1 \pm 4,8
1h 20 min – 1h 40 min	69,6 \pm 1,8	137,8 \pm 1,1	205,4 \pm 7,0
1h 40 min – 2h	35,7 \pm 1,7	143,0 \pm 8,4	197,0 \pm 4,9
23h 30 min – 24h	23,8 \pm 1,1	70,7 \pm 3,2	131,3 \pm 3,2
24h – 24h 30 min	23,8 \pm 1,1	71,5 \pm 4,2	98,4 \pm 6,9
47h 30 min – 48h	23,8 \pm 1,1	71,5 \pm 4,2	131,3 \pm 3,2
48h – 48h 30 min	23,9 \pm 1,6	71,9 \pm 3,77	124,9 \pm 12,4

Para a temperatura mais elevada é possível verificar que nas primeiras horas ocorrem algumas oscilações nos valores de RO_2 , havendo até um aumento, contrariamente ao que acontece para as amostras armazenadas a temperaturas mais baixas. A amostra que mostra menores oscilações é a armazenadas a 10 $^{\circ}C$.

Ao fim de 48 h a amostra armazenada a 2 $^{\circ}C$ apresentou um valor de RO_2 de 23,9 \pm 1,6 $mL.kg^{-1}.h^{-1}$. Já a amostra armazenada a 10 $^{\circ}C$ tinha um valor de RO_2 de 71,9 \pm 3,7 $mL.kg^{-1}.h^{-1}$. A amostra armazenada a 20 $^{\circ}C$ apresentava um valor de 124,9 \pm 12,4 $mL.kg^{-1}.h^{-1}$ de RO_2 ao fim de 48 h.

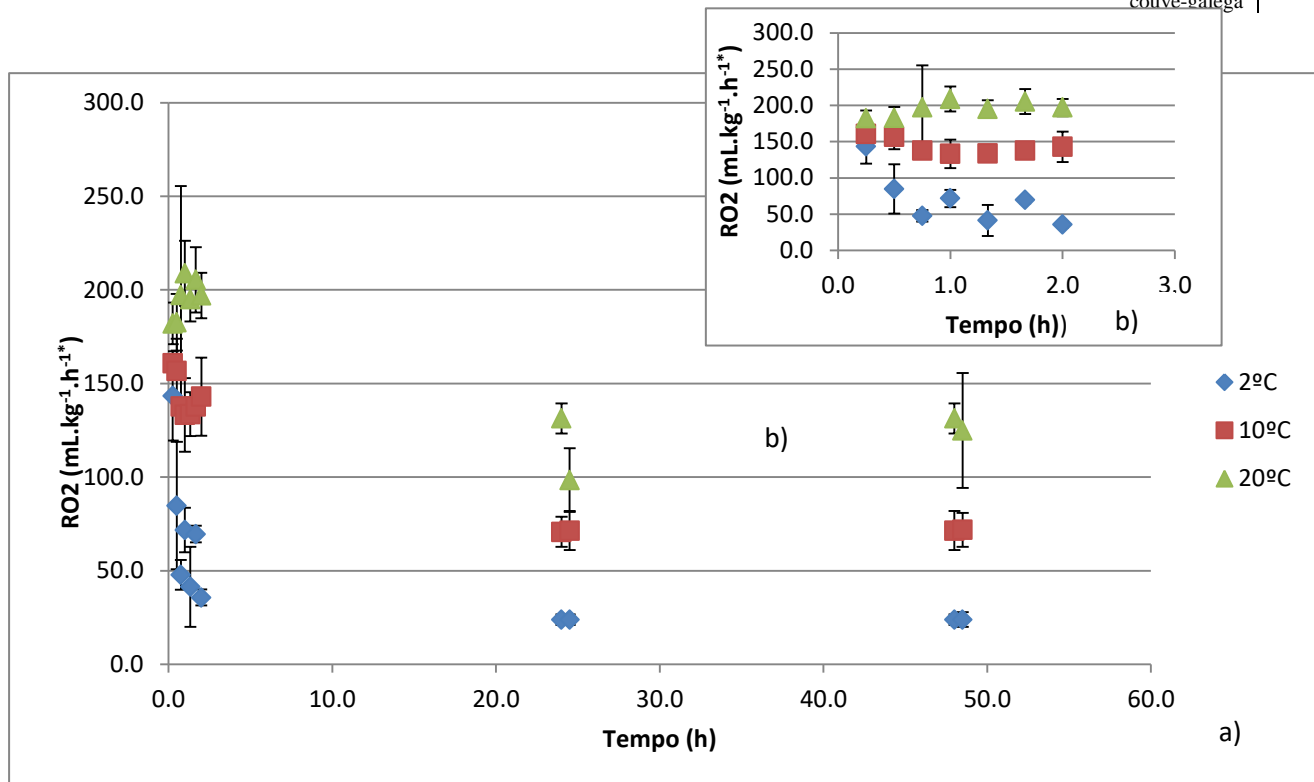


Figura 16 - Valores de RO_2 ($\text{mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de couve-galega ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) de armazenamento. Pontos são média de 3 réplicas e barras intervalo de confiança a 95 %. a) Pontos obtidos durante 48h 30 min. b) Pontos obtidos nas primeiras 2h de medição.

Os valores de RCO_2 apresentados na Tabela 12 e Figura 17 mostram que ocorre também uma diminuição ao longo do tempo.

Tabela 12 - Valores de RCO_2 ($\text{mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de couve-galega ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) de armazenamento.

Tempo (h)	RCO_2 ($\text{mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$)		
	2°C	10°C	20°C
0h – 0h 15 min	$139,1 \pm 3,6$	$148,9 \pm 0,0$	$156,6 \pm 5,2$
0h 15 min – 0h 30 min	$97,3 \pm 4,0$	$143,0 \pm 8,4$	$156,6 \pm 5,2$
0h 30 min – 0h 45 min	$47,6 \pm 2,3$	$103,4 \pm 17,1$	$157,6 \pm 3,9$
0h 45 min – 1h	$47,6 \pm 2,3$	$92,4 \pm 0,0$	$153,9 \pm 1,3$
1h – 1h 20 min	$47,3 \pm 8,5$	$107,8 \pm 5,5$	$157,6 \pm 3,9$
1h 20 min – 1h 40 min	$47,3 \pm 8,5$	$106,1 \pm 4,9$	$153,0 \pm 0,0$
1h 40 min – 2h	$35,7 \pm 1,7$	$106,1 \pm 4,9$	$157,6 \pm 3,9$
23h 30 min – 24h	$23,8 \pm 1,1$	$71,5 \pm 4,2$	$112,5 \pm 13,1$
24h – 24h 30 min	$24,3 \pm 1,0$	$54,9 \pm 12,6$	$86,6 \pm 5,6$
47h 30 min – 48h	$23,8 \pm 1,1$	$65,8 \pm 12,3$	$99,7 \pm 8,5$
48h – 48h 30 min	$27,6 \pm 5,7$	$59,5 \pm 13,9$	$98,6 \pm 11,7$

As amostras armazenadas a 20°C parecem não ter um grande decréscimo de RCO_2 nas primeiras 2 horas, contrariamente ao que ocorre com as amostras armazenadas a 2°C e 10°C , sendo que a diminuição é maior, para a amostra refrigeradas à temperatura mais baixa. A variação pouco notória dos valores de RCO_2 para a amostra armazenada a 20°C não está em completa concordância com os resultados da medição da taxa de respiração no Estudo I, uma vez que nesse estudo a variação aparenta ser mais acentuada.

Ao fim de 1 dia e de 2 dias as amostras tendem a estabilizar os seus valores de RCO_2 , sendo que os valores mais baixos foram obtidos pela amostra armazenada a 2°C e a amostra armazenada a 20°C é a que apresenta, ao longo do tempo, os valores de RCO_2 mais elevados.

O estudo de Fonseca (2002) mostra que a taxa de produção de CO_2 para amostras armazenadas a 20°C sofre um decréscimo com o tempo, passando de $405,5 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $161,7 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, valor obtido ao fim de 24 h e que se mantém estável até as 48h.

Comparando o valor obtido ao fim de 48 h para a taxa de produção de CO_2 da amostra armazenada a 20°C verifica-se que o valor experimental ($98,6 \pm 11,7 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) é inferior ao da literatura. Esta diferença poder-se-á dever ao facto das couves utilizadas terem diferentes origens geográficas e, conseqüentemente uma exposição a climas diferentes que alteram a fisiologia da couve-galega. Outra justificação poderá ser o facto do equipamento utilizado para monitorização da atmosfera ser menos preciso.

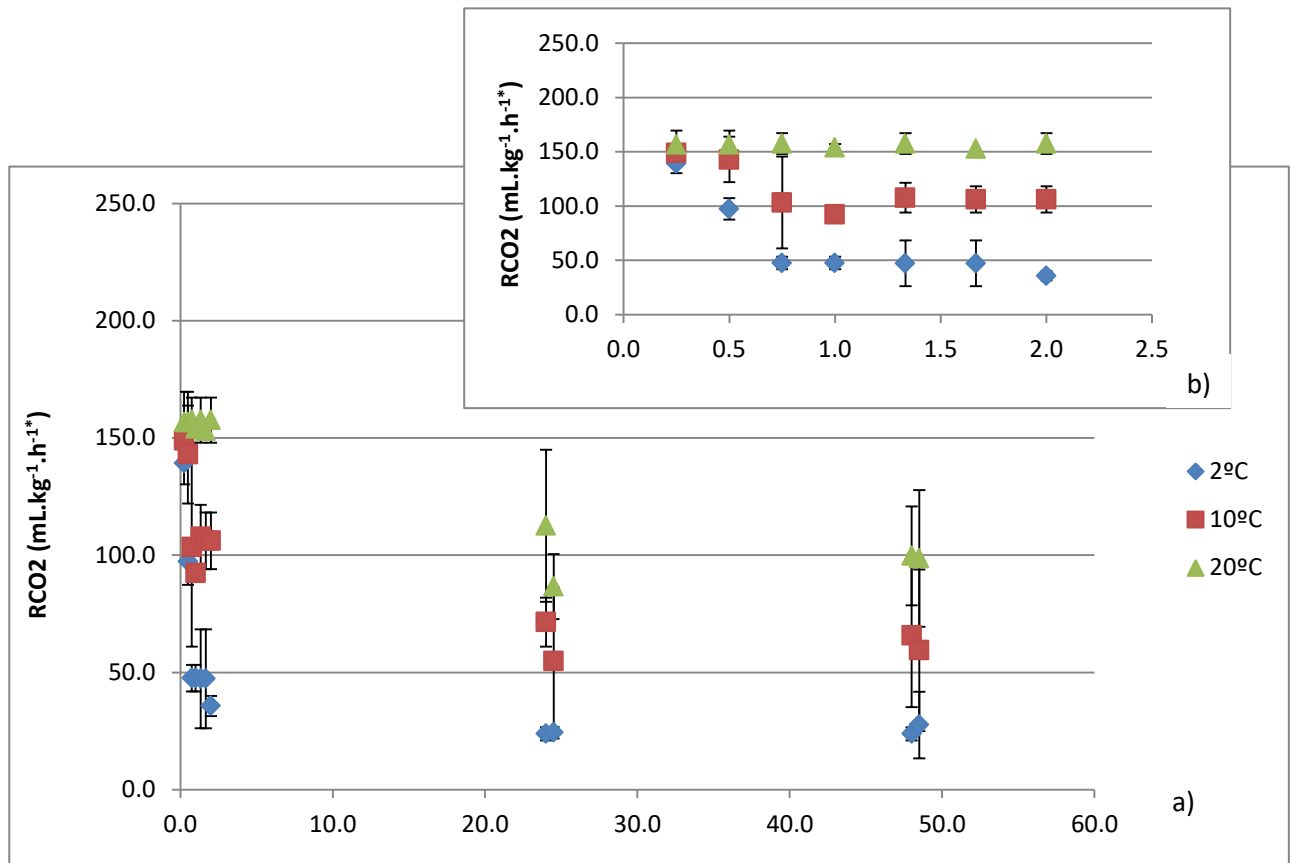


Figura 17 - Valores de RCO_2 ($\text{mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de couve-galega ao longo do tempo (h) ao longo do tempo (h) e da temperatura ($^\circ\text{C}$) de armazenamento. Pontos são média de 3 réplicas e barras intervalo de confiança a 95 %. a) Pontos obtidos durante 48h 30 min. b) Pontos obtidos nas primeiras 2h de medição.

Para verificar a relação que existe entre os valores de RO_2 e RCO_2 , pode recorrer-se ao cálculo de RQ, cujos valores se encontram apresentados na Tabela 13.

Os valores apresentados não variam muito com o tempo de armazenamento nem com a temperatura a que são expostos durante esse mesmo armazenamento. Todos os valores determinados encontram-se entre 0,6 e 1,3.

Tabela 13 - Valores de RQ de couve-galega ao longo do tempo (h) e da temperatura (°C) de armazenamento.

Tempo (h)	RQ		
	2 °C	10 °C	20 °C
0h – 0h 15 min	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1
0h 15 min – 0h 30 min	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,0
0h 30 min – 0h 45 min	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,3
0h 45 min – 1h	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,1
1h – 1h 20 min	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
1h 20 min – 1h 40 min	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,0	1,0 ± 0,3
1h 40 min – 2h	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
23h 30 min – 24h	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,0
24h – 24h 30 min	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,5	0,8 ± 0,1
47h 30 min – 48h	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1
48h – 48h 30 min	1,3 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,0

Comparativamente com valores encontrados na literatura (Fonseca, 2002) os valores de RQ ao fim de cerca de 48 h encontra-se entre $0,82 \pm 0,12$ e $0,97 \pm 0,17$ para amostras armazenadas a 10 °C. Como é possível verificar os valores obtidos vão de encontro aos valores presentes no estudo de Fonseca (2002).

Para amostras armazenadas a 20 °C o estudo referido anteriormente mostra que os valores de RQ ao fim de 48h estão compreendidos entre $0,78 \pm 0,08$ e $0,92 \pm 0,10$, que, mais uma vez, está de acordo com os valores obtidos (Fonseca, 2002).

5. CONCLUSÃO

Uma vez que se tem dado cada vez mais importância ao papel que os vegetais têm na alimentação humana, surge a necessidade de conhecer a sua composição de forma mais detalhada, de forma a estudar os efeitos que cada um dos compostos e as interações que entre estes podem ocorrer têm para a saúde do consumidor.

Relativamente à avaliação da cor, através do cálculo do TCD, é possível verificar que esta não é influenciada em grande extensão pelo processamento que foi aplicado às amostras de couve-galega, pois as diferenças de TCD foram pouco significativas.

O teor de água avaliado rondou os $89,3 \pm 0,8$ % para as amostras que sofreram higienização, sendo que a única onde esta operação não foi aplicada apresenta um teor de água mais baixo (após corte, sem higienização). Isto ocorre devido à incorporação de parte da água utilizada para a higienização na matriz do alimento.

De forma semelhante é de notar que a amostra não higienizada é a que apresenta um maior teor em compostos fenólicos e flavonóides e é também a que demonstra ter a maior capacidade antioxidante de todas as avaliadas. Isto deverá ocorrer porque as amostras que estão em contacto com a água durante o processo de higienização perdem parte dos seus compostos por lixiviação.

Para todas as medições de compostos bioativos efetuadas e para a capacidade antioxidante, resultado da presença desses e de outros compostos não avaliados neste trabalho, verifica-se uma recuperação parcial dos mesmos ao longo do tempo e de forma geral para todas as medições.

Estas recuperações não são lineares e nem sempre são significativas, sendo possível notar que para a maioria das determinações as amostras armazenadas por 24 h são as que geralmente apresentam a maior recuperação dos compostos e da atividade antioxidante. De forma geral temperaturas mais elevadas são responsáveis pelo aumento dos compostos dentro do mesmo tempo de armazenamento. Apesar de tudo, a influência destes dois parâmetros nos teores e na atividade antioxidante avaliados não ocorre de forma semelhante para todos os compostos e métodos utilizados.

Presume-se que a recuperação é causada pelo *stress* a que a couve-galega está exposta durante o armazenamento, uma vez que há um aumento dos compostos e da capacidade antioxidante, de forma geral, quando o tempo de armazenamento é superior e quando a temperatura a que a couve-galega é submetida é também ela superior. Visto que os compostos bioativos são metabólitos secundários responsáveis pela proteção contra o meio em que os vegetais estão inseridos, será de pensar que condições desfavoráveis à couve-galega e que lhe causem *stress*, promovam a produção deste tipo de compostos.

Comparativamente a outros vegetais é possível verificar que a couve-galega apresenta um teor em compostos fenólicos superior ao da couve-roxa, mas a sua capacidade antioxidante, avaliada pelo método de FRAP e pelo método ABTS, é inferior.

Já comparando a couve-galega com vários tipos de alface verifica-se que a alface apresenta um teor em flavonóides superior ao da couve-galega, assim como uma maior atividade antioxidante avaliada pelo método de DPPH.

Apesar de não ser o vegetal com a melhor composição em compostos bioativos, a couve-galega continua a ser uma boa alternativa a outro tipo de couves, sendo essa a razão que a leva a incorporar a roda da alimentação mediterrânea com algum destaque.

De forma a maximizar o teor em compostos bioativos e atividade antioxidante outros métodos de higienização deverão ser estudados para que, quando utilizados na couve-galega, permitam uma maior retenção das substâncias com efeitos protetores para a saúde humana, potenciando esses efeitos. O recurso a novas técnicas de processamento, que vêm trazer alternativas às mais comuns, poderá ser uma solução a aplicar.

Os resultados referentes à taxa de respiração do produto mostram que durante o armazenamento ocorre uma diminuição no consumo de O_2 e na produção de CO_2 para todas as temperaturas, sendo que quanto maior a temperatura maiores são os valores de RO_2 e RCO_2 .

Apesar da diferença de valores entre temperaturas, todas aparentam ter o mesmo comportamento, diminuindo os valores de RO_2 e RCO_2 durante as primeiras horas, ocorrendo depois uma estabilização desses valores ao fim de 24h, que se torna mais notória ao fim do segundo dia.

Estes resultados vão de encontro ao esperado (Fonseca, 2002), uma vez que com o passar do tempo a atividade metabólica da couve-galega decresce, havendo uma menor necessidade de consumo de O_2 ocorrendo, consequentemente, uma diminuição na produção de CO_2 .

No futuro deverá ser estudado o efeito do processamento nesta couve, uma vez que a sua forma mais comum de consumo é como parte integrante de sopas, podendo este tratamento térmico causar alterações na composição da couve-galega.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allende, A., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I. (2006). Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends in Food Science & Technology*(17), 513-519.
- Alves, R. C., Costa, A.S.G., Jerez, M., Casal, S., Sineiro, J., Nuñez, M.J. et al. (2010). Antiradical activity, phenolic profile, and hidroxyethylfurfural in Espresso Coffee: influence of technological factors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(23), 12221-12229.
- Asami, D. K., Hong, Y., Barrett, D.M., Mitchell, A.E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*(61), 1237-1241.
- Ayaz, F. A., Glew, R.H., Millson, M., Huang, H.S., Chuang, L.T., Sanz, C., Hayirhoglu-Ayaz, S. (2006). Nutrient contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.). *Food Chemistry*(96), 572-579.
- Becerra-Moreno, A., Alanís-Garza, P.A., Mora-Nieves, J.L., Mora-Mora, J.P., Jacobo-Velázquez. (2014). Kale: An excellent source of vitamin C, pro-vitamin A, lutein and glucosinolates. *Journal of Food Engineering*, 12(3), 298-303.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In P. Lester (Ed.), *Methods in enzymology* (pp. 15-27): Academic Press.
- Berardinelli, A., Pasquali, F., Cevoli, C., Trevisani, M., Ragni, L., Mancusi, R., Manfreda, G. (2016). Sanitisation of fresh-cut celery and radicchio by gas plasma treatments in water medium. *Postharvest Biology and Technology*(111), 297-304.
- Borneo, R., León, A.E., Aguirre, A., Ribotta, P., Cantero, J.J. (2009). Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. *Food Chemistry*(112), 664-670.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Application. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 221-247.
- Burda, S., W. Oleszek, et al. (1990). Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *J. Agric. Food Chem*(38), 945-948.
- Caldas, A. F. (2014). *Avaliação das propriedades antioxidantes do bagaço de mirtilo como potencial conservante alimentar*. (Masters), Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Caleb, O., Mahajan, P.V., Al-Said, F.A., Opara, U.L. (2013). Modified atmosphere packaging technology of fresh and fresh-cut produce and the microbial consequences-A review. *Food Bioprocess Technology*(6), 303-329.
- Candeias, V. Gorduras Alimentares. In D. G. d. Saúde (Ed.). Retrived on 2016
- Carvalho, D. (2008). *Estudo de compostos fenólicos de bebidas com potencial actividade anti-tumoral. Efeitos biológicos in vitro*. (Masters), Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Chauvet, M. (1985). *Les noms des crucifères alimentaires à travers les langues européennes*. Universidade de Paris.
- Cristobal, L. e. a. (2000). Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in vitro. *J. Agric. Food Chem*.(48), 3876-3884.
- Dias, J. S. (1995). The Portuguese tronchuda cabbage and galega kale landraces: a historical review. *Genetic Resources and Crop Evolution*(42), 179-194.

- Faour-Klingbeil, D., Kuri, V., Todd, E.C.D. (2016). The influence of pre-wash chopping and storage conditions of parsley on the efficacy of disinfection against *S. Typhimurium*. *Food Control*(65), 121-131.
- Faour-Klingbeil, D., Murtada, M., Kuri, V., Todd, E.C.D. (2016). Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East. *Food Control*(62), 125-133.
- Feroli, F., Giambanelli, E., D'Antuono, L.F., Costa, H.S., Albuquerque, T.G., Silva, A.S., Hayran, O., Koçaoglu, B. (2013). Comparison of leafy kale populations from Italy, Portugal, and Turkey for their bioactive compound content: phenolics, glucosinolates, carotenoids, and chlorophylls. *Journal of the Sciences of Food And Agriculture*(93), 3478-3489.
- Fonseca, S., Oliveira, F., Frias, J., Brecht, J., Chau, K. (2002). Modelling respiration rate of shredded Galega kale for development of modified atmosphere packaging. *Journal of Food Engineering*(54), 299-307.
- Fonseca, S. C., Oliveira, F.A.R., Brecht, J.K., Chau, K.V. (2005). Influence of low oxygen and high carbon dioxide on shredded Galega kale quality for development of modified atmosphere packages. *Postharvest Biology and Technology*(35), 279-292.
- Fuchs-Tarlovsky, V. (2013). Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition*(29), 15-21.
- Gonçalves, R. M. F. (2007). *Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais. Efeito antinutricional de bebidas comuns*. (Masters), Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Grosso, G., Mistretta, A., Frigiola, A., Gruttadauria, S., Biondi, A., Basile, F., Vitaglione, P., D'orazio, N., Galvano, F. (2014). Mediterranean Diet and Cardiovascular Risk Factors: A Systematic Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*(54), 593-610.
- Hertog, M. G. L., P. C. H. Hollman, et al. (1993). Estimation of daily intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults. *The Netherlands. Nutr. Cancer*(20), 21-29.
- INSA. Tabela Composicional de Alimentos - Couve galega crua. Retrieved from <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacaoOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailAlimento.aspx?ID=IS558> on 2016
- Korantzopoulos, P., Galaris, D., Papaioannides, D., Siogas, K. (2003). The possible role of oxidative stress in heart failure and the potential of antioxidant intervention. *Medical Science Monitor*, 9(6), 140-145.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. (2002). Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *The American Journal of Medicine*, 113, 71-88.
- Liu, R. H. (2004). *Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action*. Paper presented at the International Research Conference in Food, Nutrition, and Cancer.
- Liu, R. H. (2013). Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. *Journal of Food Science*, 78, 18-25.
- Llacuna, L., Mach, N. (2012). Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 16(1), 16-24.
- Maffei, D. F., Alvarenga, V.O., Sant'Ana, A.S., Franco, B.D.G.M. (2016). Assessing the effect of washing practices employed in Brazilian processing plants on the quality of ready-to-eat vegetables. *Food Science and Technology*(69), 474-481.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, XVII(6), 271-278.
- Meireles, A., Giaouris, E., Simões, M. (2016). Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Research International*(82), 71-85.

- Murador, D. C., Mercadante, A.Z., de Rosso, V.V. (2016). Cooking techniques improve the levels of bioactive compound and antioxidant activity in kale and red cabbage. *Food Chemistry*(196), 1101-1107.
- Murcia, M. A., Jiménez-Monreal, A.M., García-Diz, L., Carmona, M., Maggi, L., Martínez-Tomé, M. (2009). Antioxidant activity of minimally processed (in modified atmospheres), dehydrated and ready-to-eat vegetables. *Food and Chemical Toxicology*(47), 2103-2110.
- Naczek, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*(1054), 95-111.
- Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., Bacchiocca, M. . (2005). Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *British Journal of Nutrition*(93), 257-266.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2008). Effect of minimal processing on bioactive compounds and color attributes of fresh-cut tomatoes. *Food Science and Technology*(41), 217-226.
- Oliveira, M., Abadias, M., Usall, J., Torres, R., Teixidó, N., Viñas, I. (2015). Application of modified atmosphere packaging as a safety approach to fresh-cut fruits and vegetables - A review. *Trends in Food Science & Technology*(46), 13-26.
- Palma-Salgado, S., Pearlstein, A.J., Luo, Y., Park, H.K., Feng, H. (2014). Whole-head washing, prior to cutting, provides sanitization advantages for fresh-cut Iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *International Journal of Food Microbiology*(179), 18-23.
- Peng, Y., Zhang, Y., Ye, J. (2008). Determination of phenolic compounds and ascorbic acid in different fractions of tomato by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*(56), 1838-1844.
- Pi-Sunyer, F. X. (1993). Medical hazards of obesity. *Annals of Internal Medicine*, 119(7), 655-660.
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M.D., Ibáñez, E., Herrero, M. (2010). Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*, 43(10), 2341-2348.
- Prior, R. L., Cao, G. (2000). Antioxidant Phytochemicals in Fruits and Vegetables: Diet and Health Implications. *HortScience*, 35(4), 588-592.
- Ramalho, V. C., Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), 755-760.
- Reyes, L. F., Villareal, J. E., Cisneros-Zevallos, L. (2007). The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry*(101), 1254-1262.
- Robles-Sánchez, R. M., Rojas-Graü, M.A., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G.A., Martín-Belloso, O. (2009). Effect of minimal processing on bioactive compounds and antioxidant activity of fresh-cut 'Kent' mango (*Mangifera indica* L.). *Postharvest Biology and Technology*(51), 384-390.
- Rodrigues, S. F. (2016). Roda da Alimentação Mediterrânica. Retrieved from https://sigarra.up.pt/fcnaup/pt/noticias_geral.ver_noticia?p_nr=8186
- Rosa, E., Heaney, R. (1996). Seasonal variation in protein, mineral and glucosinolate composition of Portuguese cabbages and kale. *Animal Feed Science Technology*(57), 111-127.
- Rossi, S. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.*(16), 144-158.
- Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Díez-Marqués, C. (2003). Extending shelf-life and nutritive value of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.), by controlled atmosphere storage: macronutrients. *Food Chemistry*(80), 309-315.

- Santos, J., Herrero, M., Mendiola, J.A., Oliva-Teles, M. T., Ibáñez, E., Delerue-Matos, C. (2014). Fresh-cut aromatic herbs: Nutritional quality stability during shelf-life. *Food Science and Technology*(59), 101-107.
- Saura-Calixto, F. G., I. (2009). Definition of the Mediterranean Diet Based on Bioactive Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*(49), 145-152.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000). *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. Paper presented at the Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine.
- Sies, H. (1997). Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Experimental Physiology*(82), 291-295.
- Sillani, S., Nassivera, F. (2015). Consumer behavior in choice of minimally processed vegetables and implications for marketing strategies. *Trends in Food Science & Technology*(46), 339-345.
- Sousa, J. B. A. S. P. (2011). *Actividade Biológica de derivados do ácido cafeico: efeito antioxidante e anti-inflamatório*. (Master), Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*(64), 178-189.
- Vale, A. P., Santos, J., Brito, N.V., Marinho, C., Amorim, V., Rosa, E., Oliveira, M.B.P.P. (2015). Effect of refrigerated storage on the bioactive compounds and microbial quality of Brassica oleraceae sprouts. *Postharvest Biology and Technology*(109), 120-129.
- Volden, J., Borge, G.I.A., Bengtsson, G.B., Hansen, M., Thygesen, I.E., Wicklund, T. (2008). Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. spp. capitata f. rubra). *Food Chemistry*(109), 595-605.
- Wennberg, M., Ekvall, J., Olsson, K., Nyman, M. (2006). Changes in carbohydrate and glucosinolate composition in white cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) during blanching and treatment with acetic acid. *Food Chemistry*(95), 226-236.